

Entwicklung von DNA-Origami-Nanoadaptoren für die Einzelmolekül-Positionierung in  
Nanoaperturen und der Einfluss eines plasmonischen Systems auf den  
Förster-Resonanz-Energietransfer

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Enrico Pibiri

aus Wolfsburg

1. Referent:	Professor Dr. Philip Tinnefeld
2. Referent:	Privatdozent Dr. Christof Maul
eingereicht am:	20.12.2017
mündliche Prüfung (Disputation) am:	07.03.2018
Druckjahr 2018	

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

- Pibiri, E.; Holzmeister, P.; Lalkens, B.; Acuna, G. P.; Tinnefeld, P. Single-molecule positioning in zeromode waveguides by DNA origami nanoadapters. Nano letters **2014**, 14, 3499–3503.
- Schmied, J. J.; Raab, M.; Forthmann, C.; Pibiri, E.; Wunsch, B.; Dammeyer, T.; Tinnefeld, P. DNA origami based standards for quantitative fluorescence microscopy. Nature protocols **2014**, 9, 1367–1391
- Holzmeister, P.; Pibiri, E.; Schmied, J. J.; Sen, T.; Acuna, G. P.; Tinnefeld, P. Quantum yield and excitation rate of single molecules close to metallic nanostructures. Nature communications **2014**, 5, 5356.
- Puchkova, A.; Vietz, C.; Pibiri, E.; Wunsch, B.; Sanz Paz, M.; Acuna, G. P.; Tinnefeld, P. DNA Origami Nanoantennas with over 5000-fold Fluorescence Enhancement and Single-Molecule Detection at 25  $\mu$ M. Nano letters **2015**, 15, 8354–8359.

## Tagungsbeiträge

- Pibiri, E.; Holzmeister, P.; Lalkens, B.; Acuna, G. P.; Tinnefeld, P. Single-molecule positioning in zeromode waveguides by DNA origami nanoadapters. Picoquant 20<sup>th</sup> Single Molecule Workshop, Berlin, **2014**

## Posterbeiträge

- Baumann, F.; Pibiri, E.; Heucke, S.; Acuna, G. P.; Holzmeister, P.; Gaub, H.E.; Tinnefeld, P.; Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy in Nanoapertures. Downscaling Science, Hannover, **2012**
- Pibiri, E.; Acuna, G.; Holzmeister P.; Lalkens, B.; Tinnefeld, P.; Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy in Nanoapertures. International School of Nanosciences, Domaine du Tremblay, **2013**

### Zusammenfassung

Die Nanotechnologie ist ein fester Bestandteil der chemischen Welt. Hierzu zählt auch die Nanophotonik, welche in den letzten Jahren immer an Bedeutung gewonnen hat. Dieses Gebiet beschäftigt sich mit der Anwendung des Lichtes auf der Nanometerskala. Nanophotonische Strukturen sind in der Lage das Licht zu kontrollieren und auch zu manipulieren. Ein prominentes Beispiel sind Zero-Mode-Waveguides (Nullmodenwellenleiter) welche auch als Nanoaperturen bezeichnet werden. Dies sind kleine Löcher in einem Aluminiumfilm, welcher auf einem Glassubstrat aufgebracht ist. Diese dienen der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie als Beobachtungskammern. Durch das kleine Beobachtungsvolumen können biologisch relevante Prozesse bei den nötigen Substratkonzentrationen untersucht werden. Diese Nanoaperturen finden Anwendung in der Echtzeit DNA-Sequenzierung. Um das Maximum aus dieser Technik zu holen, ist es notwendig, dass jeder ZMW mit genau einem Molekül beladen wird. Dies ist mit normalen, stochastischen Methoden nicht möglich. In dieser Arbeit werden Nanostrukturen auf Basis der DNA-Origami Technik präsentiert, welche als Nanoadapter fungieren. Mithilfe dieser DNA-Origami Nanoadapter kann die Top-Down Technik der nanoskaligen Strukturen mit der Bottom-Up Technik der molekularen chemischen Welt verbunden werden. Durch den Einsatz der Nanoadapter können die ZMWs mit genau einem Molekül beladen werden. Auf der Oberseite der Nanoadapter befindet sich ein Fluoreszenzfarbstoffmolekül und auf der Unterseite Biotin-Anker, um eine sterische Kontrolle der Anbindung zu gewährleisten. Die DNA-Origami-Nanoadapter erhöhen die Beladungsquote mit einzelnen Molekülen weit über die übliche Poisson-Verteilung und erhöhen gleichzeitig auch die Homogenität der spektroskopischen Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe in den Nanoaperturen.

Neben den ZMWs spielen metallische Nanopartikel eine wichtige Rolle. Diese kommen unter anderem als plasmonische Nanoantennen zum Einsatz. Durch die Wechselwirkung mit Licht sind die Nanopartikel in der Lage lokalisierte Oberflächenplasmonen auszubilden. Diese Plasmonen haben einen großen Einfluss auf die fotophysikalischen Eigenschaften des Fluorophors, wenn dieser sich in unmittelbarer Nähe der Nanopartikel be-

findet. Durch diese Konstellation kann die Fluoreszenz des Fluorophors erheblich verstärkt werden. Aufgrund dieser Eigenschaft ist es interessant, welchen Einfluss die Nanopartikel auf den Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) besitzen. Befinden sich zwei Farbstoffe nahe beieinander, kann ein strahlungsloser Energieübertrag von einem zum anderen Farbstoff erfolgen. FRET hat sich als ein wichtiges Werkzeug in der biophysikalischen Chemie etabliert. Um einen genauen Einblick über den Einfluss der plasmonischen Struktur auf den FRET-Mechanismus zu erhalten, wurde eine Nanoantenne auf Basis der DNA-Origami Technik verwendet. Dadurch ist es möglich, das FRET-Paar exakt im Hotspot zweier Nanopartikel zu platzieren. Außerdem besitzt die Nanoantenne Anbindestellen für bis zu zwei Goldnanopartikel. In dieser Arbeit wird der Einfluss des plasmonischen Systems im Hinblick auf die FRET-Effizienz und auf die FRET-Rate näher untersucht. Hierzu werden zwei verschiedene Nanoantennen verwendet, die sich in ihrer FRET-Effizienz unterscheiden (eine sehr hohe und niedrige FRET-Effizienz). Dazu kommen Goldnanopartikel unterschiedlicher Größen zum Einsatz, um den Einfluss auf den FRET-Mechanismus besser zu untersuchen. Die Energietransfereffizienz wird durch die Präsenz der Goldnanopartikel verringert und die Messungen zeigen, dass die Nanopartikel einen schwachen Einfluss auf die Energietransferrate haben.

## Abstract

Nanotechnology is an integral part of the world of chemistry. Progress in this area enabled the fabrication of “nanophotonic” structures capable of controlling and manipulating light at the nanoscale. A prominent example are zero mode waveguides also known as nanoapertures. They consist of small holes in an aluminum film deposited onto a glass substrate. These small holes are used as detection volumes for single molecule fluorescence applications. Biological processes can now be observed in the relevant concentration range that is necessary for most enzymes. This technique has experienced a strong technological development and it is exploited commercially in the third generation of DNA sequencing methods. However, despite this tremendous progress it is still challenging to make use of the full potential of this technique, as ZMWs are filled with a single polymerase stochastically reaching a maximum occupation limited by Poisson statistics to around 37%. In this work, DNA origami nano-adapters are presented to connect top down nanostructures with the bottom world of chemistry. Through the incorporation of these nano-adapters the single molecule occupation of ZMWs can be strongly enhanced. Every zmw can be filled with exact one molecule. In addition, on the upper surface of each DNA origami structure, a fluorophore is placed to demonstrate a general docking position for e.g. enzymes or biological probes. On the bottom, there are four biotin anchors to guarantee a steric hindrance immobilization. The DNA origami nano-adapters thus overcome Poissonian statics of molecule positioning and further improve the photophysical homogeneity of the immobilized fluorescent dyes.

Besides the ZMWs, metallic nanoparticles play an important role in the field on nanophotonics. This nanosized objects are exploited as optical antennas since they are capable of concentrating incident light through the excitation of localized surface plasmons. Thus these nanoparticles have a major influence on the photophysical properties of the fluorophores placed at the immediate vicinity of the nanoparticles. This constellation can significantly increase the fluorescence intensity of the fluorophore. Due to this property, it is interesting to determine what influence the nanoparticles have on the Förster-Resonance-Energy-Transfer (FRET). FRET has established itself as an important

tool in biophysical chemistry. To get a detailed insight about the influence of the plasmonic structure on the FRET mechanism a nanoantenna based on the DNA origami technique was used. Thereby it is possible to place the FRET pair a control distance to a single nanoparticle. In this work, the influence of the plasmonic systems on the FRET efficiency and FRET-rate is studied. Moreover, two different systems, which differ in their FRET-efficiency (one with a high- and the other with a low FRET-value), are used. In addition, gold-nanoparticles of different sizes are exploited to better examine the influence on the FRET mechanism. The energy transfer efficiency is reduced in the presence of gold nanoparticles and the measurements show that the nanoparticles have a weak influence on the energy transfer rate.



## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	i
Abstract .....	iii
1. Einleitung .....	3
2. Theorie .....	9
2.1 Fotophysikalische Grundlagen .....	9
2.2 Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) .....	13
2.3 Alternierende Laseranregung (ALEX) und FRET-Korrekturen .....	17
2.4 Zero-Mode-Waveguides .....	18
2.5 Goldnanopartikel .....	21
2.6 DNA .....	24
2.6.1 Eigenschaften und Aufbau der DNA .....	24
2.6.2 DNA-Origami .....	25
3. Material und Methoden .....	28
3.1 Konfokales Mikroskop .....	28
3.2 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung .....	30
3.3 Extinktionsmessung .....	33
3.4 Rasterkraftmikroskopie (AFM – Atomic Force Microscopy) .....	34
3.4.1 AC-Mode / Tapping Mode (Alternate Current Mode) .....	35
3.4.2 Vorbereitung und Messung der DNA-Origami mit dem AFM .....	36
3.5 Herstellung der DNA-Origami Strukturen .....	36
3.6 DNA-Origami-Nano-Adapter .....	37
3.7 DNA-Origami-Nanoantenne .....	39

3.8	Farbstoffe .....	41
3.9	Vorbereitung der Oberflächen für die Immobilisierung der DNA-Nanoantenne .....	42
3.10.	Goldnanopartikel.....	43
3.11	Funktionalisierung der Goldnanopartikel.....	44
3.12	ZMW Vorbereitung.....	45
4.	Ergebnisse und Diskussionen .....	47
4.1	Positionierung und Beladung von Einzelmolekülen in ZMWs mit DNA-Origami-Nanoadaptoren.....	47
4.1.1	AFM-Aufnahmen der DNA-Origami-Nanoadapter .....	47
4.1.2	Beladung der ZMWs .....	49
4.1.3	Fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften in den ZMWs.....	56
4.1.4	Eigenschaften der Fluoreszenzintensität der Farbstoffe in den ZMW.....	62
4.2	Eigenschaften des FRET-Wertes im Hotspot einer DNA-Origami Nanoantenne.....	64
4.2.1	Einfluss der Goldnanopartikel auf die Fluoreszenzlebensdauer .....	71
4.2.2	Einfluss der Goldnanopartikel auf den FRET .....	72
5.	Ausblick.....	77
6.	Literaturverzeichnis .....	79
7.	Anhang.....	88
7.1	FCS Messungen an ZMW durchgeführt durch Jerome Wenger:.....	88
7.2	Sequenzen der verwendeten Oligos für die Nanodisk .....	93
7.3	Sequenzen der unmodifizierten und modifizierten Oligos des NRO .....	98
7.4	Sequenzen der DNA-Origami-Nanoantenne .....	103
	Danksagung .....	112

### 1. Einleitung

Viele biologische Prozesse, ohne die das Leben nicht möglich wäre, spielen sich auf einer Längenskala im Nanometerbereich ab, die wir mit unseren Sinnen nicht wahrnehmen können. Erst durch die Entwicklung der Mikroskopie gelang es der Menschheit, einen Einblick in den faszinierenden Mikrokosmos zu erhalten. Mithilfe der ersten Lichtmikroskope konnten erstmals einzelne Zellen beobachtet werden <sup>1</sup>. Dieser Blick eröffnete viele biologische Fragestellungen in Bezug auf die genaue Struktur von Zellen und Proteinen sowie die Funktionsweise von Enzymen. Durch diese Fragestellungen erhielt die Entwicklung der optischen Mikroskopie-Methoden einen enormen Schub. Die Auflösung wurde immer besser und überwand schließlich auch durch die Superauflösungsmikroskopie das Beugungslimit<sup>2-7</sup>.

#### **Die Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie**

Erfindungen wie das Elektronenmikroskop<sup>1</sup>, das Rastertunnelmikroskop<sup>8</sup> und das Rasterkraftmikroskop<sup>9</sup> stellten Meilensteine in der Mikroskopie-Welt dar. All diese Methoden konnten die Auflösung erheblich verbessern, doch ein Problem ergab sich in der Biokompatibilität. Die Probenpräparation erwies sich als nicht biokompatibel (das Rastertunnelmikroskop benötigt eine leitende Oberfläche und das Rasterkraftmikroskop eine möglichst glatte Oberfläche). Einen großen Fortschritt und einen anderen Ansatz zur Untersuchung von biologischen Proben stellte die Fluoreszenzmikroskopie dar<sup>10,11</sup>. In den letzten 20 Jahren hat insbesondere die Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie einen großen Fortschritt gemacht und sich zu einem wichtigen Werkzeug in der biophysikalischen Chemie etabliert. Es gilt nun eine Möglichkeit zu erarbeiten, um die Detektion einzelner Moleküle für ein breites Anwendungsspektrum zur Verfügung zu stellen. Hierbei besteht folgende Anforderung:

- Um Moleküle einzeln detektieren zu können, darf sich im Detektionsvolumen im Mittel maximal ein Molekül aufhalten. Bei beugungsbegrenzten Mikroskopietechniken ist es daher notwendig die Probe bis in den nanomolaren Bereich zu verdünnen, dies hat jedoch den Nachteil, dass Enzyme nicht mehr

untersucht werden können, da diese häufig eine Substratkonzentration im mikro- bis millimolaren Bereich benötigen (siehe Abb. 1-1).

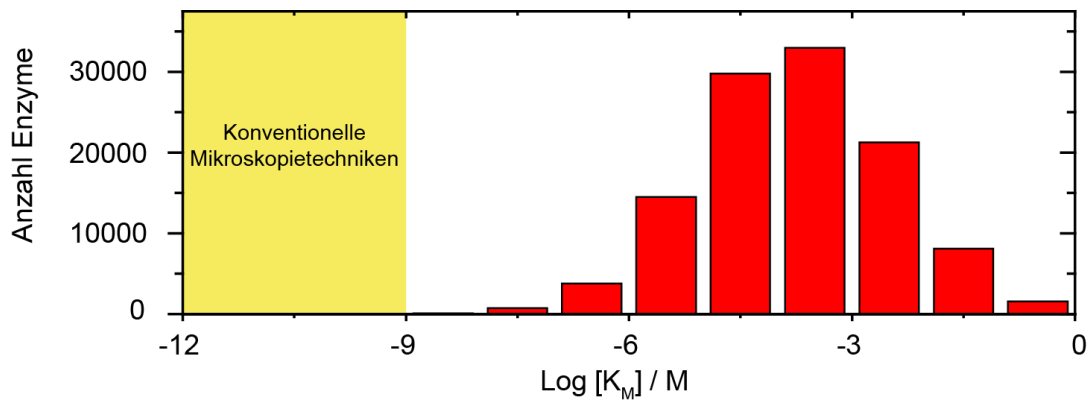


Abbildung 1-1: Übersicht der Michaelis-Menten Konstanten aus über 80000 Enzymen

(<http://www.brenda-enzymes.org>). Die meisten Enzyme benötigen eine Substratkonzentration im mikro- bis millimolaren Bereich. Konventionelle Mikroskopietechniken wie das konfokale- und das TIRF-Mikroskop arbeiten bei Konzentrationen im piko- bis nanomolaren Bereich<sup>12,13</sup>.

### Nanophotonik und Plasmonik

Das Gebiet der Nanophotonik und Plasmonik befasst sich mit der Kontrolle des Lichtes auf der Nanometerskala<sup>14</sup>. Nanophotonische Strukturen sind in der Lage, dass optische Detektionsvolumen stark zu verkleinern oder auch das Fluoreszenzsignal zu verstärken. Zwei prominente Vertreter sind die Zero-Mode-Waveguides (ZMWs= Nullmodenwellenleiter auch als Nanoaperturen bezeichnet) und die plasmonischen Nanoantennen.

### Zero-Mode-Waveguides und DNA-Sequenzierung

1977 publizierte Sanger das Prinzip der Sequenzierungsmethode<sup>15</sup>. Diese wird häufig auch als "First Generation" der DNA-Sequenzierung bezeichnet. Aufgrund der Entwicklungen in der Forschung konnte diese Methode den Ansprüchen nicht mehr gerecht werden. Ein weiterer wichtiger Punkt sind natürlich auch die Kosten. 2001 betrugen die Kosten für die Sequenzierung des menschlichen Genoms ungefähr 100 Millionen \$ (siehe Abb. 1-2).

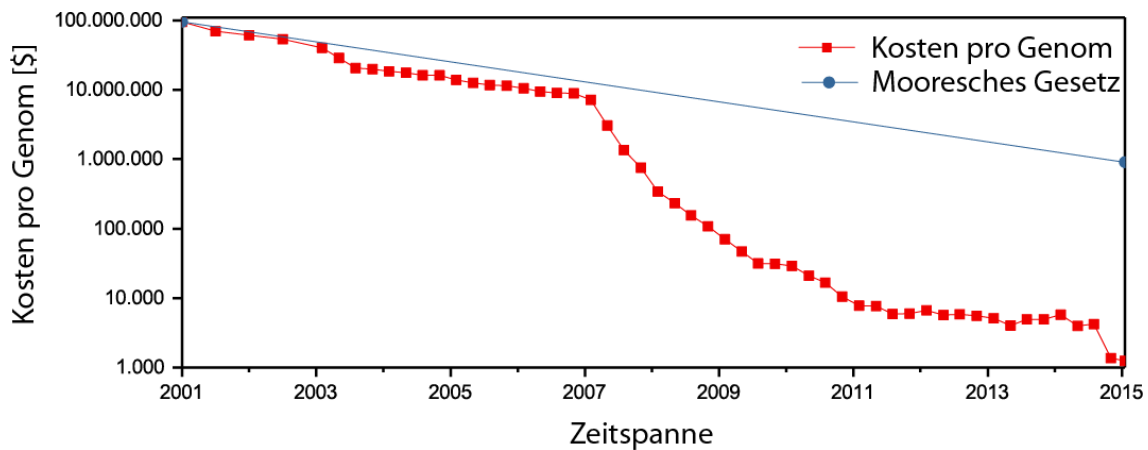


Abbildung 1-2: Aufgetragen sind die Kosten für die Sequenzierung eines Genoms über einen Zeitraum von 14 Jahren. Zu erkennen ist, dass im Gegensatz zum Mooreschen Gesetz die Kosten erheblich gesunken sind<sup>16</sup>.

Aufgrund der hohen Kosten musste eine schnellere und effiziente Lösung gefunden werden. Die DNA-Sequenzierungstechnik von Pacific Biosciences nutzt dazu Zero-Mode-Waveguides. Diese Technik ermöglicht die Bestimmung von bis zu 500 Basenpaaren pro Sekunde in Echtzeit<sup>17</sup>. Hierbei wird die DNA-Polymerase auf den Boden der ZMW gebunden und durch eine Farbstoffmarkierung der vier Basen (Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin), kann der Einbau in Echtzeit beobachtet werden<sup>18</sup> (Abb. 1-3).

Ein großer Vorteil der ZMWs ist die Kombinierbarkeit mit konventionellen Setups, wie bspw. der konfokalen Mikroskopie. Ein Problem besteht jedoch in der Beladung der ZMWs. Bisher wurden ZMWs stochastisch beladen. Dabei können maximal 37 % aller ZMWs nur mit exakt einer einzelnen Polymerase beladen werden<sup>18</sup>. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Position der Polymerase innerhalb der ZMW. Die Metallwände der Nanoapertur haben einen großen Einfluss auf die photophysikalischen Raten der Fluorophore. Die Metalle können für eine Erhöhung oder auch Reduzierung der Fluoreszenzlebensdauern und Fluoreszenzintensitäten verantwortlich sein<sup>19,20</sup>. Um diese Heterogenität zu verhindern, sollte die Polymerase möglichst im Zentrum sein, um ein homogenes Signal zu erhalten.

Durch den Einsatz eines Rasterkraftmikroskops konnte bereits gezeigt werden, dass es möglich ist, Moleküle mittig in den ZMWs zu positionieren<sup>21</sup>. Ein Nachteil dieser Methode liegt in ihrem aufwendigen Ablauf. Die Moleküle können nur nacheinander in den ZMWs platziert werden und es werden zwei Setups benötigt.

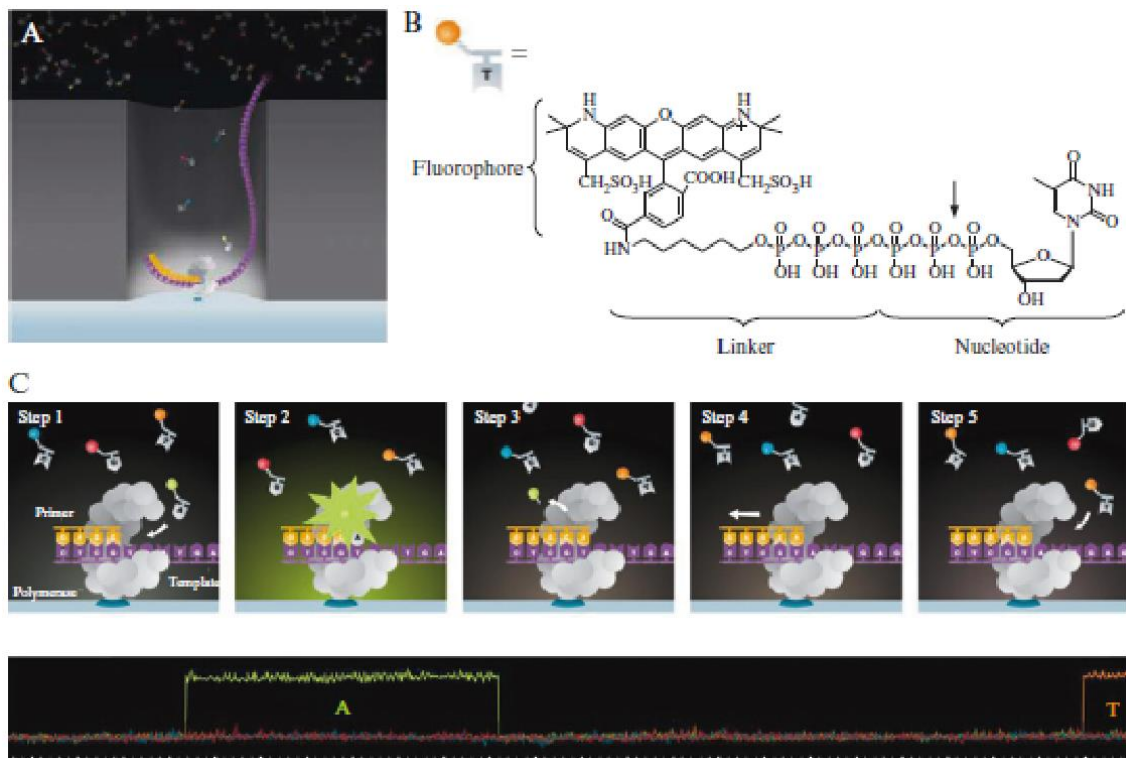


Abbildung 1-3: Das Prinzip der Echtzeit-Einzelmolekül DNA-Sequenzierung. A) Eine einzelne DNA-Polymerase ist am Boden der ZMW gebunden. B) Die Detektion erfolgt in Echtzeit über Nukleotide, welche über Linker am dritten Phosphatrest mit einem Fluorophor markiert sind. Jeder der vier Basen, ist dabei mit einem anderen Fluorophor markiert. C) Schematische Darstellung der Schritte für den Einbau der Nukleotide. Im ersten Schritt ist die Polymerase umgeben von den fluoreszenzmarkierten Nukleotiden, dem Primer und dem zu komplementierenden DNA-Strang (Template). Im zweiten Schritt erfolgt die Bindung zwischen dem Nukleotid und dem DNA Strang. Nur bei dieser Bindung gelangt das Fluorophor, welches an dem Nukleotid gebunden ist, in den Beobachtungsbereich der ZMW und wird durch die Fluoreszenz detektiert. Das untere Bild zeigt eine typische Fluoreszenzintensitätspur. Dadurch kann das eingebaute Nukleotid bestimmt werden. Der dritte Schritt beinhaltet den Einbau des Nukleotids und die Abspaltung des Fluorophors. 4. Die Polymerase gelangt zur nächsten Position des DNA-Strangs. Bei Schritt 5 beginnt der Prozess von vorne. Wiedergabe aus Lit.[17] mit Genehmigung von Pacific Biociences.

### Nanoadapter auf Basis der DNA-Origami Technik

2006 stellte Paul Rothemund die DNA-Origami Technik vor<sup>22</sup>. Ein langer in sich geschlossener DNA-Einzelstrang wird mithilfe von kleinen kürzeren DNA-Strängen in eine vordefinierte Form gefaltet. Dadurch können 2- aber auch 3-dimensionale Nanostrukturen hergestellt werden<sup>23</sup>. In dieser Arbeit wurden mithilfe der DNA-Origami Technik Nanoadapter entwickelt, welche eine effizientere und parallele Beladung ermöglichen. Das Design der Nanoadapter wurde so konzipiert, dass sich die Anbindestellen für die modi-

fizierte ZMW-Oberfläche mittig an der Unterseite befinden. Ein Fluoreszenzfarbstoffmolekül befindet sich mittig auf der Oberseite und repräsentiert eine Andockstelle für biologische Moleküle. Die Beladung in den ZMWs wurde anschließend mittels der konfokalen Mikroskopie überprüft. Zusätzlich wurden die spektroskopischen Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe in den ZMWs hinsichtlich der Fluoreszenzlebensdauer und der Fluoreszenzintensität näher untersucht.

### **Förster Resonanzenergietransfer in einer plasmonischen Nanoantenne**

1948 beschrieb Theodor Förster die nach ihm benannte zwischenmolekulare Energiewanderung zwischen zwei Farbstoffen (FRET= Förster-Resonanz-Energie-Transfer)<sup>24</sup>. Seit dieser Entdeckung spielt FRET in der aktuellen Forschung eine wichtige Rolle. Er findet Anwendung vor allem in der Biochemie<sup>25,26</sup> und Molekularbiologie. FRET ist nicht nur auf zwei Farbstoffe begrenzt, sondern es konnte auch gezeigt werden, dass der Energietransfer auf bis zu fünf Farbstoffe funktioniert<sup>27–32</sup>. Die Kombination FRET mit der Nanophotonik ist Gegenstand aktueller Forschung und viele Arbeitsgruppen befassen sich mit dem Einfluss eines plasmonischen Systems auf den FRET-Mechanismus. Um FRET in Anwesenheit eines plasmonischen System näher zu untersuchen, wurde auch hier auf die DNA-Origami Technik zurückgegriffen. Es wurde eine DNA-Nanoantenne konstruiert, die auf beiden Seiten Andockstellen für bis zu zwei Goldnanopartikel bietet. Durch die zwei Goldnanopartikel entsteht ein sogenannter Hotspot, in welcher die Fluoreszenz eines Fluorophors verstärkt wird. Die Goldnanopartikel fungieren dabei wie eine Art Linse, in welcher das Signal der Fluoreszenz eine Erhöhung bis zu einem Faktor 100 erfährt<sup>19</sup>. Durch die Positionierung eines FRET-Paares im Hotspot können Rückschlüsse auf die FRET-Effizienz und auch die FRET-Rate gezogen werden. Im Vorfeld wird der Einfluss der Goldnanopartikel auf den FRET theoretisch beschrieben. Zur Kontrolle werden zwei unterschiedliche FRET-Paare verwendet, die sich in ihrer FRET-Effizienz unterscheiden. Ein Paar besitzt einen hohen und das andere einen niedrigen FRET-Wert. Die ersten Schritte bestehen in der Überprüfung des Designs mittels der Rasterkraftmikroskopie. Anschließend werden Goldnanopartikel unterschiedlichen Durchmessers an die Nanoantenne

gebunden, um eine Abhängigkeit zwischen der FRET-Effizienz und dem Partikeldurchmesser zu untersuchen. Die gemessenen Werte werden mit Literaturwerten verglichen und anschließend diskutiert. Im Weiteren werden Vermutungen über die Änderung der FRET-Rate aufgrund der gewonnen Daten aufgestellt und diskutiert.



## 2. Theorie

In diesem Kapitel werden die Grundlagen beschrieben, die zum Verständnis der vorliegenden Arbeit beitragen. Im ersten Abschnitt werden die Fotophysikalischen Grundlagen erläutert. Neben den allgemeinen Eigenschaften wie der Fluoreszenz wird auch der Förster-Resonanz-Energietransfer näher erläutert. Anschließend werden die Eigenschaften der Zero-Mode-Waveguides erläutert. Das letzte Unterkapitel beinhaltet die Goldnanopartikel und deren Einfluss auf die Fotophysikalischen Raten des Fluorophors sowie auf den FRET-Mechanismus.

### 2.1 Fotophysikalische Grundlagen

Moleküle können mit Licht wechselwirken. Diese Wechselwirkung beruht auf der Absorption eines Photons. Die Energie des Photons ist dabei durch das Planck'sche Gesetz gegeben:

$$\Delta E = E_{\lambda} = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad 2-1$$

Mit  $E$  der Energie,  $h$  der Planck'schen Konstante,  $c$  der Lichtgeschwindigkeit und  $\lambda$  der Wellenlänge des Photons. Durch die Absorption eines Photons kann das Molekül in einen angeregten Zustand gelangen. Dies geschieht jedoch nur, wenn die Energie des Photons genau dem Betrag zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand des Moleküls entspricht. Befindet sich das Molekül im angeregten Zustand, kann es auf verschiedenen Wegen wieder in den Grundzustand gelangen, wobei zwischen einer strahlenden und einer strahlungslosen Desaktivierung unterschieden wird. Eine komplette Übersicht über diese Vorgänge sind in einem Jablonski-Diagramm dargestellt (Abb.2-1). Bei der Internen Konversion bzw. dem Intersystem Crossing handelt es sich jeweils um isoenergetische strahlungslose Übergänge zwischen unterschiedlichen elektronischen Zuständen. Diese Art der Energieabgabe tritt am häufigsten auf. Die Anregungsenergie wird dabei auf thermische Weise an die Umgebung bzw. an andere Moleküle abgegeben. Die zweite Möglichkeit besteht in der strahlenden Desaktivierung. Hierbei gibt es zwei Fälle zu unterscheiden, die Phosphoreszenz und die Fluoreszenz. Befindet sich das Molekül in dem Schwingungsgrundzustand des angeregten Zustandes, kann die strahlende Desaktivierung durch eine spontane Emission eines Photons erfolgen, welches als

Fluoreszenz bezeichnet wird. Die Zeitskala auf der sich die Fluoreszenz abspielt, liegt im Nanosekundenbereich.

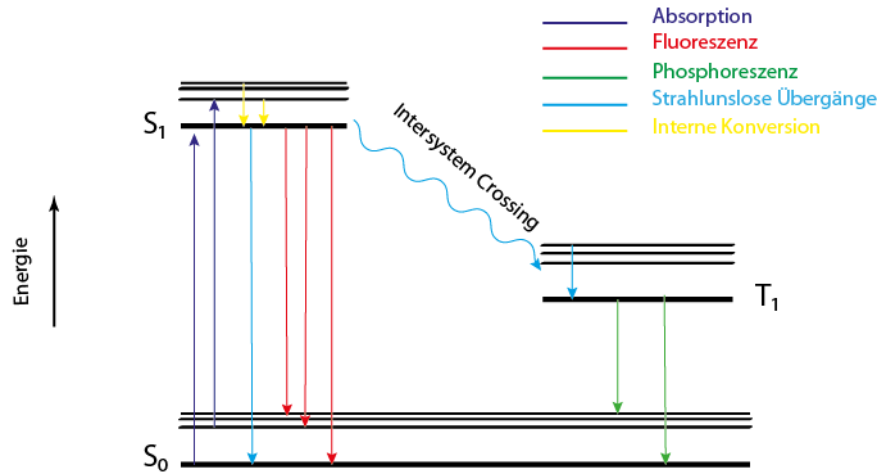


Abbildung 2-1: Typische Übergänge in einem Jablonski-Diagramm. Nach der Absorption eines Photons kann das Molekül über verschiedene Wege wieder in den Grundzustand  $S_0$  gelangen. Dabei wird unter Fluoreszenz, Phosphoreszenz und strahlungslosen Übergängen unterschieden. Erfolgt die Desaktivierung durch eine spontane Emission, wird von Fluoreszenz gesprochen. Durch die Interkombination kann das Molekül in einen Triplett-Zustand gelangen. Von dort gelangt es durch die Phosphoreszenz wieder in den Grundzustand.

Die Phosphoreszenz hingegen spielt sich dabei auf einer typischen Zeitskala im Millisekunden Bereich ab (die Zeitskala kann sich bei der Phosphoreszenz auch auf Stunden ausdehnen). Dieses Phänomen lässt sich nur durch eine Art Speicher bzw. Reservoir erklären, in welcher das Molekül die Energie zwischenspeichern kann. Befindet sich das Molekül im angeregten Zustand, kann es durch Interkombination von einem Singulett- in einen Triplett-Zustand übergehen. Dabei ändert sich die Ausrichtung des Elektronenspins. Bei einem Singulettzustand sind die Spins antiparallel ( $\uparrow\downarrow$ ) und bei einem Triplettzustand parallel ( $\uparrow\uparrow$ ) ausgerichtet. Dieser Übergang ist nur durch die Spin-Bahn Kopplung möglich, da der Übergang normalerweise Spin-Verboten ist. Erfolgt aus dem Triplett-Zustand die strahlende Desaktivierung wird von Phosphoreszenz gesprochen. Bei der Fluoreszenz fällt auf, dass diese bei einer höheren Wellenlänge stattfindet als bei der Absorption. Eine Erklärung hierfür liefert das Franck-Condon Prinzip (Abb. 2-2).

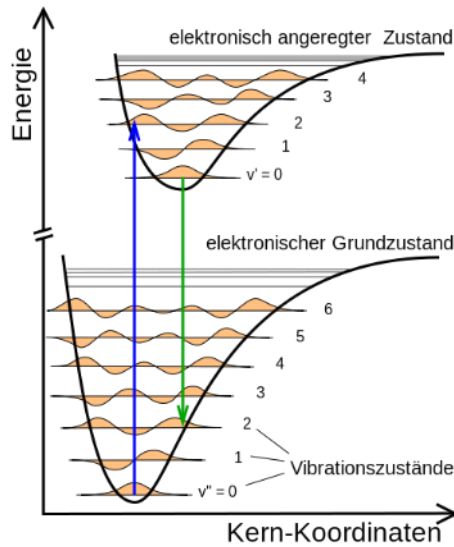


Abbildung 2-2: Beispiel des Franck-Condon Prinzips bei einem zweiatomigen Molekül. Die Anregung eines Elektrons erfolgt immer senkrecht zu den Kernkoordinaten. Dadurch gelangt das Elektron meistens in einen höheren angeregten vibronischen Zustand. Wiedergabe aus Lit.<sup>[33]</sup> mit Genehmigung von Onno Gabriel.

Das emittierte Photon ist damit energieärmer und besitzt eine höhere Wellenlänge. Die resultierende Emission weist deshalb eine Rotverschiebung auf. Dieses Phänomen wird als Stokes-Shift bezeichnet und ist von fundamentaler Bedeutung für die Fluoreszenzspektroskopie (Abb. 2-3). Mit geeigneten Filtern kann das Absorption- vom Emissionslicht getrennt werden. Somit erfolgt nur die Detektion des Emissionslichtes.

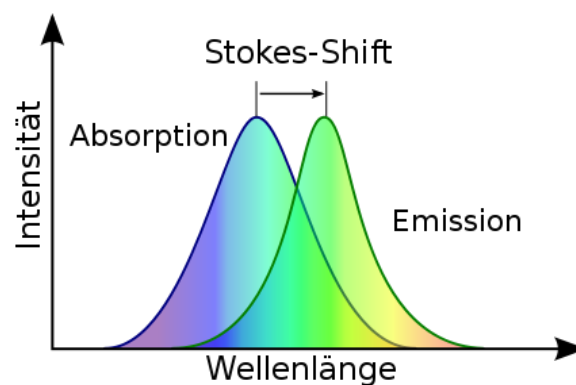


Abbildung 2-3: Die Emission weist die typische Rotverschiebung auf, da das emittierte Photon energieärmer ist. Das Absorption- und Emissionsspektrum können durch geeignete Filter getrennt werden, sodass nur die Fluoreszenz detektiert wird<sup>34</sup>.

Als Fluoreszenzfarbstoffe werden am häufigsten organische Verbindungen verwendet (siehe Abb.2-4). Diese besitzen ein ausgedehntes  $\pi$ -System welches aus alternierenden Einfach- und Doppelbindungen besteht. Das  $\pi$ -System kann vereinfacht als Potentialtopf mit endlicher Breite betrachtet werden, da die  $\pi$ -Bindungen der Kohlenstoffatome delokalisiert sind und sich die Elektronenorbitale überlappen. Moleküle mit einem ausgedehntem  $\pi$ -System besitzen eine höhere rotverschobene Absorption/Emission als solche mit einem kleineren  $\pi$ -System.

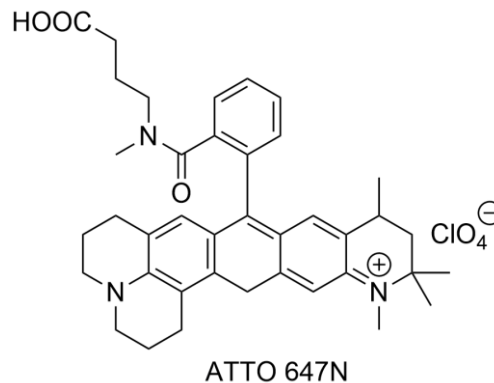


Abbildung 2-4: Struktur von ATTO 647N. Der Farbstoff besitzt ein ausgedehntes  $\pi$ -System und emittiert im roten Spektralbereich<sup>35</sup>.

Eine wichtige Kenngröße in der Fluoreszenzspektroskopie ist die Quantenausbeute.  $\phi_{Fl}$  der fluoreszierenden Farbstoffe:

$$\phi_{Fl} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad 2-2$$

Die Quantenausbeute beschreibt dabei das Verhältnis zwischen den emittierten und den absorbierten Photonen. Die radiative Rate  $k_r$  und die nicht radiative Rate  $k_{nr}$  sorgen für eine Depopulation des angeregten Zustandes. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Quantenausbeute.

Die Zeit, in welcher sich ein Fluorophor im angeregten Zustand befindet wird als Fluoreszenzlebensdauer bezeichnet und ist definiert durch:

$$\tau_{Fl} = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad 2-3$$

## 2.2 Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

1948 beschrieb Theodor Förster eine Theorie über eine Energiewanderung zwischen zwei Molekülen<sup>24</sup>. Dabei befindet sich das Donor-Molekül im angeregten und das Akzeptor-Molekül im Grundzustand. Liegen diese nun nahe beieinander (2-10 nm), kann der Donor durch eine Dipol-Dipol Wechselwirkung seine Energie strahlungslos auf den Akzeptor übertragen. Der Akzeptor gelangt dann durch die Fluoreszenz wieder in den Grundzustand (Abb.2-4).

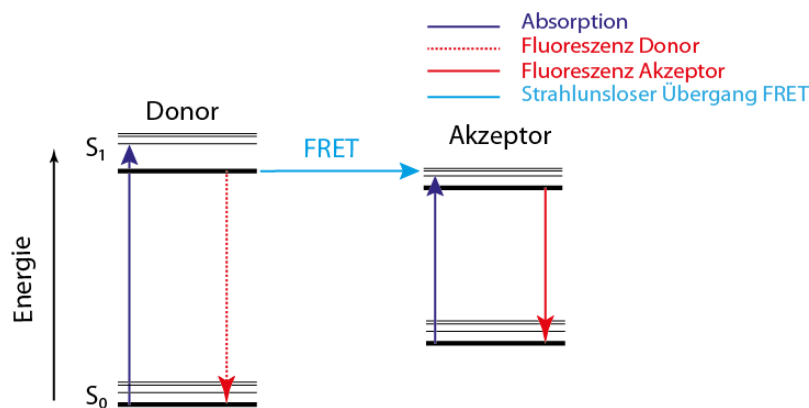


Abbildung 2-4: Vereinfachtes Termschema für den strahlungslosen Energieübertrag. Der Donor wird angeregt, emittiert jedoch kein Photon, sondern überträgt seine Energie strahlungslos an den Akzeptor. Der Akzeptor emittiert dann ein Photon und gelangt in den Grundzustand.

Die Rate des Energietransfers ( $k_{ET}$ ) bei einem Abstand  $r$  ist dabei gegeben durch<sup>36</sup>:

$$k_{ET} = \frac{\phi_D \kappa^2}{\tau_D r^6} \left( \frac{9 \ln 10}{128 \pi^5 N_A n^4} \right) \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad 2-4$$

mit  $\phi_D$  der Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors,  $\kappa^2$  den Orientierungsfaktor,  $\tau_D$  der Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors,  $N_A$  der Avogadro-Kontante,  $n$  dem Brechungsindex des Medium und  $\int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$  dem Überlappungsintegral ( $J$ ) zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Die Effizienz des Der Förster-radius  $R_0$  entspricht dabei dem Abstand, bei welchem die Transfereffizienz 50 % beträgt.

Der Försterradius ist für jedes Donor-Akzeptor-Paar unterschiedlich und muss individuell bestimmt werden. Der Verlauf der FRET-Effizienz in Abhängigkeit des Försterradius ist in Abb.2-5 dargestellt.

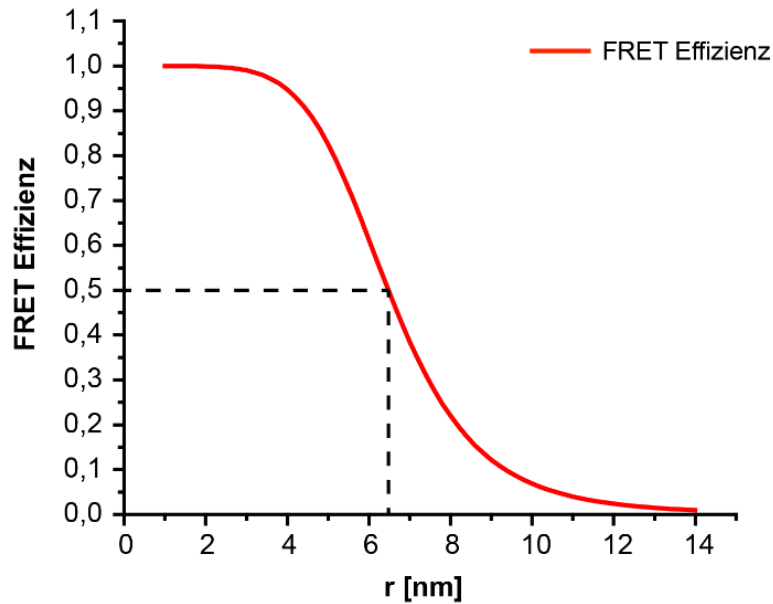


Abbildung 2-5: Aufgetragen ist die FRET-Effizienz gegen den Radius für das Donor-Akzeptor Paar Cy3B und Atto 647N welches in dieser Arbeit verwendet wurde. Der Förster beträgt für dieses Paar 6.49 nm bei dem die FRET-Effizienz 50 % beträgt.

Der Försterradius  $R_0$  ist wie folgt definiert:

$$R_0^6 = \frac{9 \ln 10 \kappa^2 Q_D}{128 \pi^5 N_A n^4} \frac{\int d\lambda F_D(\lambda) \epsilon_a(\lambda) \lambda^4}{\int d\lambda F_D(\lambda)} \quad 2-5$$

Anhand von Gleichung 2.6 ist es möglich den Förster Radius für jedes beliebige FRET-Paar zu berechnen. Gleichung 2.4 kann dann durch Gleichung 2.6 vereinfacht werden zu:

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \quad 2-6$$

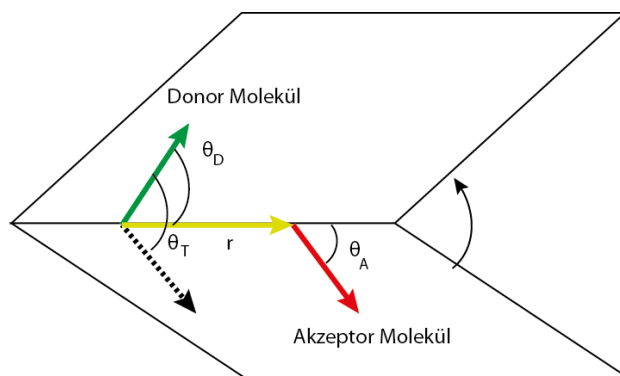
$\tau_D$  beschreibt die Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors.

Ein weiterer wichtiger Faktor beim FRET ist die Ausrichtung der Dipole von Donor und Akzeptor zueinander.

Ein Maß hierfür ist der Orientierungsfaktor.  $\kappa^2$ :

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D\cos\theta_A)^2 \quad 2-7$$

Der Winkel zwischen dem Dipol der Donor-Emission und dem Dipol der Akzeptor-Absorption ist gegeben durch  $\cos\theta_T$ ,  $\cos\theta_D$  und  $\cos\theta_A$  sowie dem Winkel zwischen dem Donor und Akzeptor Dipol des Verbindungsvektors R (Abb. 2-6).









a)  $\kappa^2 = 4$       b)  $\kappa^2 = 1$       c)  $\kappa^2 = 0$   

Abbildung 2-6: Die Abhängigkeit des Orientierungsfaktors  $\kappa^2$  von dem Dipol der Donoremission und dem Dipol der Akzeptorabsorption. der Fall a) beschreibt die bestmögliche Ausrichtung, wenn die Dipole kollinear ausgerichtet sind. Sind die Dipole parallel zueinander b) verringert sich der Wert auf 1. stehen sie senkrecht zueinander c) so ist der Wert des Orientierungsfaktor 0. Verändert nach<sup>36</sup>

Der Orientierungsfaktor kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Bei zwei sich frei rotierenden Fluorophoren nimmt der Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  den Wert  $2/3$  an<sup>37</sup>. Da der kritische Abstand mit der sechsten Potenz einhergeht, beträgt die Abweichung maximal nur 26 % Insgesamt beträgt eine mögliche Abweichung nicht mehr als 35 %.

Über die Intensität der Fluoreszenz oder der Fluoreszenzlebensdauer ist es möglich die FRET-Effizienz zu berechnen<sup>38</sup>. Bei der Berechnung über die Intensität wird das Hauptaugenmerk auf den Donor gerichtet. Die Fluoreszenzintensität des Donors in Anwesenheit des Akzeptors  $I_{da}$  und in Abwesenheit des Akzeptors  $I_d$  ist dann proportional zu:

$$I_{da} \propto \frac{k_{r,d}}{k_{r,d} + k_{nr,d} + k_{ET}} \quad 2-8$$

sowie

$$I_d \propto \frac{k_{r,d}}{k_{r,d} + k_{nr,d}} = \phi_d \quad 2-9$$

Die Anregungsrate des Akzeptors wird durch den Term  $k_{ET}$  beschrieben. Die kleinen Indizes geben an, ob es sich um den Donor  $d$  oder dem Akzeptor  $a$  handelt. Die Intensität des Akzeptors ist durch folgende Gleichung gegeben:

$$I_a \propto \frac{k_{r,a}}{k_{r,a} + k_{nr,a}} \cdot \frac{k_{ET}}{k_{r,d} + k_{nr,d} + k_{ET}} = \frac{k_{ET}\phi_a}{k_{r,d} + k_{nr,d} + k_{ET}} \quad 2-10$$

Damit ergibt sich für die FRET-Effizienz  $E$  folgender Zusammenhang:

$$E = \frac{I_d - I_{da}}{I_d} = \frac{I_a/\phi_a}{\frac{I_a}{\phi_a} + \frac{I_{da}}{\phi_d}} = \frac{k_{ET}}{k_{r,d} + k_{nr,d} + k_{ET}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad 2-11$$

Durch die Messung der Intensität des Donors in Anwesenheit und in Abwesenheit des Akzeptors ergibt sich ein Weg um die FRET Effizienz zu bestimmen.

Die zweite Möglichkeit geht über die Messung der Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Anwesenheit  $\tau_{da}$  und in Abwesenheit  $\tau_d$  des Akzeptors:

$$E = \frac{\tau_d - \tau_{da}}{\tau_d} = \frac{k_e}{k_{r,d} + k_{nr,d} + k_{ET}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad 2-12$$

Bevor das erste Experiment gestartet wird, ist es notwendig, sich auch Gedanken über die Limitierung der Technik zu machen. Als Erstes müssen zwei Farbstoffe gewählt werden, die die Voraussetzungen des Experiments genügen. Hierzu zählen die Photostabilität, die Fluoreszenzlebensdauer und auch die Intensität. Die gewählten Fluorophore sollten inert gegen jegliche chemischen Reaktionen mit der Probe sein. Auch die Größe der Farbstoffe spielt eine sehr wichtige Rolle. Die Größe sollte einen Nanometer nicht überschreiten um auch kleinste Abstandsänderung zu messen. Für die Detektion sollte der spektrale Unterschied der Donor- und Akzeptor Emission groß sein, damit keine Donor-Emission in die Akzeptor-Detektion gelangt. Außerhalb einer Distanz von 2- 8 nm ist der FRET unempfindlich, was die Abstandsänderung betrifft.



### 2.3 Alternierende Laseranregung (ALEX<sup>1</sup>) und FRET-Korrekturen

Unter realen Bedingungen, kommt es zu Phänomenen, die zu falschen FRET-Werten führen können. Eine Korrektur ist deswegen unumgänglich. Bei der Anregung des Donors, kann eine bestimmte Photonenzahl in den Akzeptordetektionskanal gelangen. Die Ermittlung der Photonenzahl erfolgt über den *Leakage*  $lk$  (Verlust). Dieser ist gegeben durch:

$$lk = \frac{F_D^A}{F_D^D} \quad 2-13$$

mit  $F_D^A$  der Photonenzahl der Akzeptoremission bei Donoranregung und  $F_D^D$  der Donoremission bei Donoranregung. Desweiteren ist es notwendig auch die sogenannte *direct excitation*  $dx$  (direkte Anregung) zu korrigieren. Hierbei wird die Akzeptorphotonenzahl bei der Anregung mit der Donorwellenlänge bestimmt. Der Quotient aus der Photonenzahl der Akzeptoremission bei Anregung mit der Donorwellenlänge  $F_D^A$  und der Akzeptorphotonenzahl bei Anregung mit der Akzeptorwellenlänge  $F_A^A$  ergibt  $dx$ :

$$dx = \frac{F_D^A}{F_A^A} \quad 2-14$$

Durch den Einsatz der alternierenden Laseranregung von Donor und Akzeptor, können sämtliche Anregung- und Detektionsmöglichkeiten ermittelt werden ( $F_D^A$ ,  $F_A^A$ ,  $F_D^D$ ,  $F_A^D$ ). Die tatsächliche Photonenzahl, die durch den FRET  $F^{FRET}$  zustande kommt, ist dann unter Berücksichtigung von Gleichung 2.13 und 2.14 gegeben durch:

$$F^{FRET} = F_D^A - lk - dx \quad 2-15$$

---

<sup>1</sup> Alternating Laser Excitation = alternierende Laseranregung

## 2.4 Zero-Mode-Waveguides

Zero-Mode-Waveguides (ZMW), auch als Nanoaperturen bezeichnet, sind kleine Löcher in einem Metallfilm, welcher auf einem Glassubstrat aufgebracht ist (Abb.2-7).

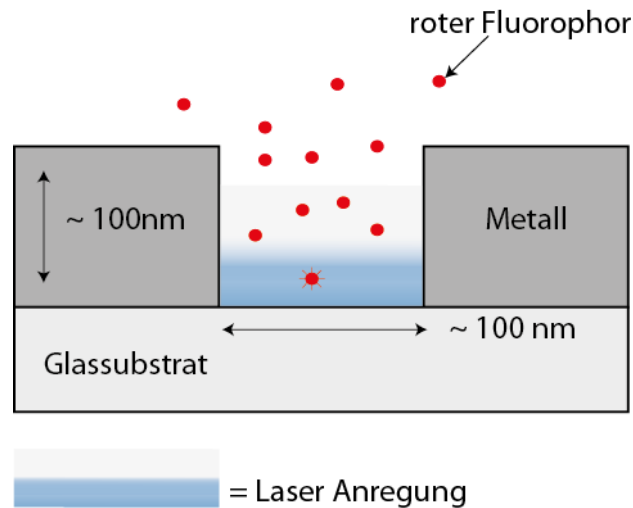


Abbildung 2-7: Eine ZMW mit einem Durchmesser von 100 nm. Nur die Fluorophore, welche sich in dem evaneszenten Feld befinden, werden angeregt.

Trifft das Licht auf die Nanoapertur wird es an den Ecken der Apertur gebeugt. Bethe konnte eine theoretische Lösung über die Ausbreitung des Lichtes in einer runden Apertur liefern (die Bedingung für seine theoretische Lösung beinhaltet, dass der Radius der Apertur sehr viel kleiner ist als die Wellenlänge des Lichtes und er ging von einem unendlich dünnen und perfekten Metallfilm der Apertur aus)<sup>39</sup>. Er zeigte, dass die Transmission mit dem Verhältnis Radius / Wellenlänge mit dem Faktor  $10^4$  abnimmt (siehe Abb. 2-8).

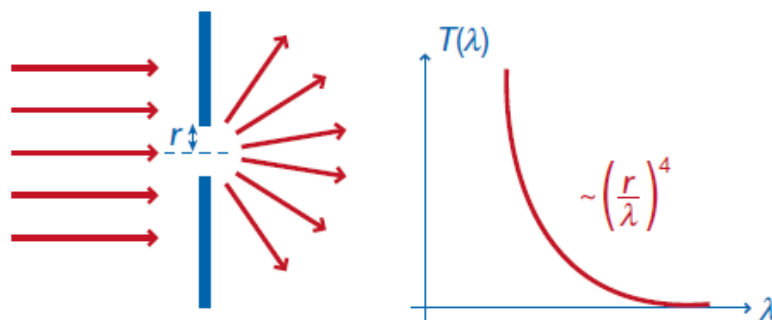


Abbildung 2-8: Beugung des Lichts an den Ecken der Nanoapertur (links) und der typische Transmissionsverlauf vom Licht des sichtbaren Spektrums für eine Nanoapertur mit einem unendlich dünnen und perfekten Metallfilm. Wiedergabe aus Lit[<sup>40</sup>] mit Genehmigung der Nature Publishing Group.

Die ZMW besitzt eine Grenzwellenlänge  $\lambda_c$  in welcher keine propagierende Lichtmode in der Apertur existiert<sup>41</sup>. Die Grenzwellenlänge  $\lambda_c$  berechnet sich durch den Durchmesser  $d$  der Apertur:

$$\lambda_c = 1,7 \cdot d \quad 2-16$$

Licht mit einer Wellenlänge größer als  $\lambda_c$  wird nicht transmittiert. Durch die Bildung eines evaneszenten Feldes, welches in z-Richtung exponentiell abfällt, können Moleküle angeregt werden. Die Intensität  $I(z)$  des Feldes ist Abhängig von der Eindringtiefe  $\Lambda$ :

$$I(z) = e^{-z/\Lambda} \quad 2-17$$

Die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes ist wiederum abhängig von der Grenzwellenlänge:

$$\frac{1}{\Lambda} = 2 \sqrt{\frac{1}{\lambda^2} + \frac{1}{\lambda_c^2}} \quad 2-18$$

Für eine Nanoapertur mit einem Durchmesser von 100 nm und einer Anregungswellenlänge von 640 nm ergibt sich nach Gleichung 2.16 - 2.18 eine Eindringtiefe von  $\sim 88$  nm bei der die Intensität auf den Wert von  $1/e$  am Eingang des ZMW abgefallen ist.

Ein weiterer Aspekt ist die Berücksichtigung der Kopplungseffizienz bei der Emission und die Quantenausbeute des Fluorophors in der Nanoapertur. Durch Simulationen konnte gezeigt werden, dass die Kopplungseffizienz der Emission, abhängig von der Tiefe, exponentiell abnimmt (Abb.2-9).

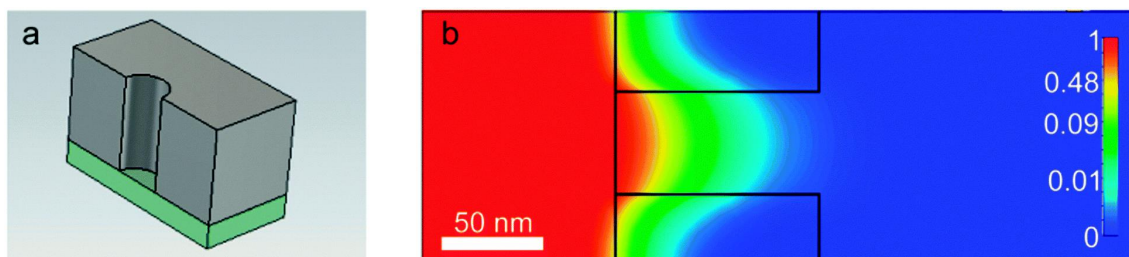


Abbildung 2-9: a) Ein ZMW mit einem Durchmesser von 50 nm. Die Dicke der Aluminium Schicht welche auf dem Glassubtrat aufgebracht ist, beträgt 100 nm. b) Numerische Simulation der Ausbreitung des elektrischen Feldes innerhalb der ZMW bei einer Anregungswellenlänge von 500 nm. Die Farbskala gibt die Stärke des evaneszenten Feldes an. Wiedergabe aus Lit.<sup>[13]</sup> mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

Die gemittelten Werte aller Dipol-Orientierungen ergeben die Dipol-Kopplungseffizienz als Funktion  $p(z)$  der Dipol-Tiefe in der Apertur.

Zur Vereinfachung wird angenommen, dass die radiative Rate und die Photonendichte der Zustände proportional zu  $p(z)$  ist. Die Quantenausbeute  $\phi(z)$  der Fluorophore in der Apertur ist dann gegeben durch:

$$\phi(z) = \frac{k_r(z)}{k_r(z) + k_{nr}} \approx \frac{p(z)}{p(z) + C} \quad 2-19$$

mit der Konstanten  $C$ . Die Konstante sorgt dafür, dass für den Fall  $\phi(0)$  die Quantenausbeute gleichzusetzen ist mit der Quantenausbeute am Eingang der Apertur<sup>17,40,42</sup>. Das resultierende Beobachtungsprofil  $S(z)$  ist dann das Produkt aus der Anregungs- und Kopplungseffizienz sowie der Quantenausbeute, abhängig von der Tiefe der Apertur:

$$S(z) = I(z)p(z) \frac{p(z)}{p(z) + C} \quad 2-20$$

Das effektive Anregungsvolumen  $V_{eff}$  ergibt sich zu:

$$V_{eff} = \frac{\pi d^2}{4} \frac{(\int S(z) dz)^2}{\int S(z)^2 dz} \quad 2-21$$

Durch diese Technik ist es möglich, Anregungsvolumina im zeptoliter Bereich zu kreieren. Mit den kleinsten Durchmessern ist eine zu erreichende Konzentration von bis zu 200  $\mu\text{M}$  möglich, wobei sich im Durchschnitt nur ein Molekül im Anregungsvolumen befindet. Die hohe Parallelisierbarkeit und die Kombination der ZMW mit konventionellen Methoden, ermöglichen eine breite Anwendung in der Einzelmolekülspektroskopie<sup>43</sup>.

## 2.5 Goldnanopartikel

Als Nanopartikel werden kleine Partikel bezeichnet, deren Größe kleiner als die Wellenlänge des Lichtes ist. Der typische Bereich erstreckt sich von 2-150 nm. Die Nanopartikel können aus unterschiedlichen Metallen wie Silber, Gold, Palladium, Silizium oder auch Nickel und Kobalt bestehen. Ein weiterer Aspekt ist die Form der Nanopartikel welche unter anderem stäbchenförmig, sphärisch und dreieckig sein können. Eine sehr interessante und nützliche Eigenschaft der metallischen Nanopartikel ist die Wechselwirkung mit Licht. Durch das elektromagnetische Feld werden die Elektronen im Nanopartikel zur Oszillation angeregt (Abb. 2-10).

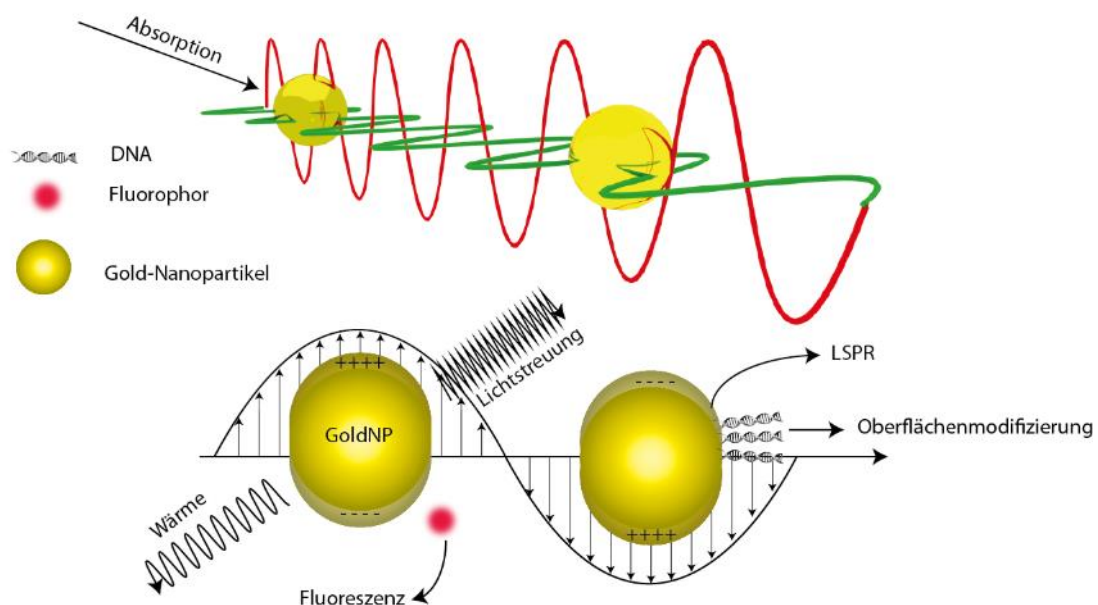


Abbildung 2-10: Die Goldnanopartikel werden durch das elektromagnetische Feld zur Oszillation angeregt. Es bilden sich lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanzen (LSPR). Die weiteren Wechselwirkungen wie Lichtstreuung, Hitze oder der Einfluss auf die Fluoreszenz der Fluorophore durch die Goldnanopartikel sind ebenfalls dargestellt. Es bietet sich auch die Möglichkeit, die Oberfläche des Goldnanopartikels mit DNA zu modifizieren.

Dadurch kommt es zur Bildung von lokalisierten Oberflächenplasmonen (LSPR<sup>2</sup>). Aufgrund dieser Eigenschaften ist der Anwendungsbereich für metallische Nanopartikel breit gestreut. Durch die Generierung von Hitze könnten bspw. die Goldnanopartikel in naher Zukunft auch gegen den Kampf von Krebs eingesetzt werden<sup>44,45</sup>. Ein weiteres

<sup>2</sup> Localized surface plasmon resonance: Oberflächenplasmonenresonanzen

großes Einsatzgebiet der Goldnanopartikel ist die als Nanoantenne<sup>19,46–56</sup>. Optische Antennen sind der Lage, freie optische Strahlung in lokalisierte Energie zu konvertieren und umgekehrt. Durch diese Technik ist es möglich, Lichtemissionen sowie die optische Sensorik zu manipulieren und zu kontrollieren. Befindet sich ein Fluorophor in unmittelbarer Nähe eines metallischen Nanopartikels, ändern sich die Fotophysikalischen Eigenschaften des Fluorophors.

Durch die erzeugten Plasmonen im Nanopartikel werden die radiativen und nichtradiativen-Raten verstärkt, sodass der angeregte Zustand des Fluorophors schneller entvölkert werden kann (Abb. 2-11).

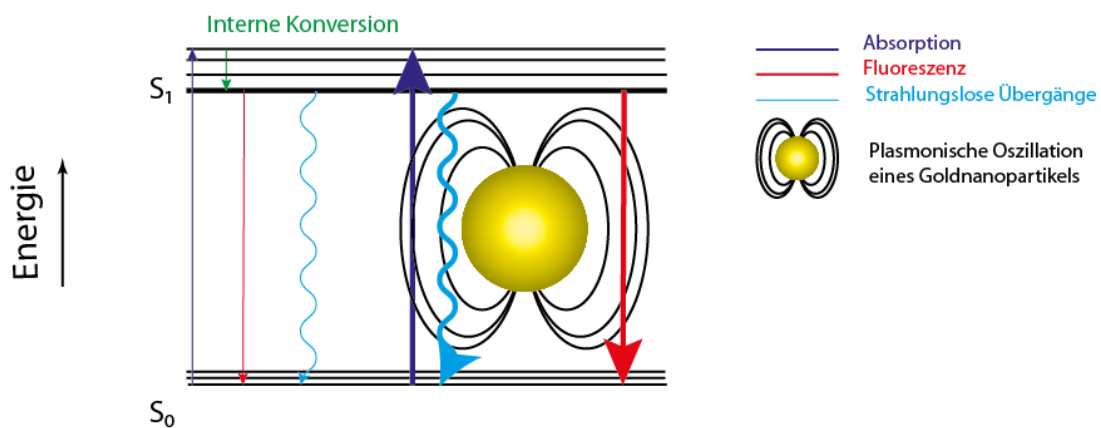


Abbildung 2-11: Dargestellt ist der Einfluss des Goldnanopartikels auf die Fotophysik des Fluorophors. Die dickeren Pfeile beschreiben eine Erhöhung der Absorption, der Fluoreszenz und den strahlungslosen Übergängen.

Der Einfluss der Nanopartikel auf die Fluorophore wird nun näher beschrieben.

Wie im Kapitel 2.1 schon erwähnt, beschreibt Gleichung 2.2 die Quantenausbeute eines Fluorophors. In Anwesenheit eines Nanopartikels ändert sich die radiative- und die nichtradiative-Rate. Damit ergibt sich für die Quantenausbeute in Anwesenheit eines Metalls ( $\phi_M$ ):

$$\phi_M = \frac{k_r'}{k_r' + k_{nr}'} \quad 2-22$$

Die Fluoreszenzlebensdauer in Anwesenheit eines Nanopartikels ( $\tau_M$ ) ist dann definiert durch:

$$\tau_M = \frac{1}{k_r' + k_{nr}'} \quad 2-23$$

Allgemein haben metallische Nanopartikel einen Einfluss auf die Raten des Fluorophors. Interessanterweise hängt die Veränderung der Raten jeweils vom Abstand zwischen Farbstoff und Nanopartikel ab. Bei einer Distanz von unter 15 nm ist der Einfluss auf die nicht-radiative Rate höher als bei der radiativen Rate. Ein Farbstoff mit einer hohen intrinsischen Quantenausbeute erfährt eine Verringerung der Quantenausbeute, wenn der Abstand zum Nanopartikel kleiner wird. Umgekehrt erfährt ein Farbstoff mit einer niedrigen Quantenausbeute eine Erhöhung bei Annäherung zu einem Nanopartikel. Bei einem Abstand jedoch von unter 15 nm, sinkt auch hier die Quantenausbeute<sup>50</sup>. Ein kritischer Punkt stellt also die Distanz zwischen Nanopartikel und Fluorophor dar<sup>57,58</sup>.

Durch diesen Einfluss des Nanopartikels ändert sich auch der FRET (Gleichung 2.12):

$$E_M = \frac{k'_{ET}}{k'_{r,d} + k'_{nr,d} + k'_{ET}} \quad 2-24$$

Es konnte in mehreren Versuchen festgestellt werden, dass der FRET zum größten Teil von den LSPR kontrolliert wird<sup>55,59,60</sup>.

## 2.6 DNA

### 2.6.1 Eigenschaften und Aufbau der DNA

Die DNA (Desoxyribonukleinsäure) stellt die kleinste Speichereinheit dar, indem die sämtliche genetische Information eines Organismus enthalten ist. Die Struktur wurde 1953 von Watson und Crick beschrieben, wofür sie auch den Nobelpreis erhalten haben<sup>61</sup>.

Sie beschrieben, dass die DNA als Doppelhelix vorliegt (siehe Abb. 2-12). Zwei

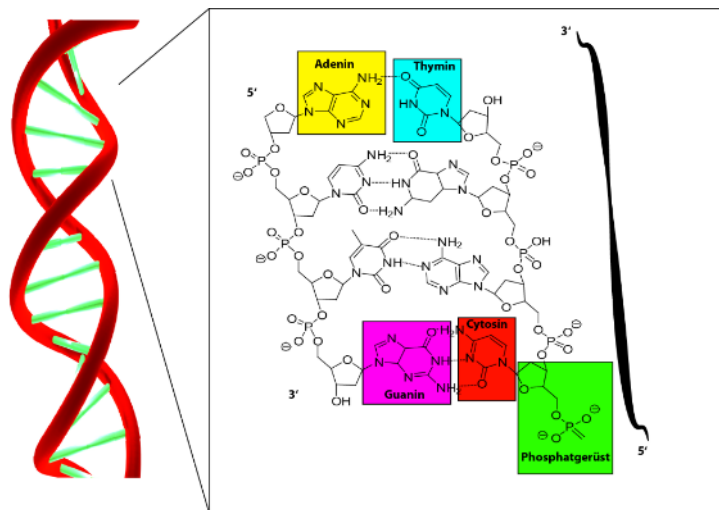


Abbildung 2-12: Abgebildet ist die DNA als Doppelhelix. Zu sehen sind die Basen, die komplementär zueinander über Wasserstoffbrücken verbunden sind. Durch Wiederholtes verknüpfen über das Phosphatgerüst vom 3' zum 5' bilden sich lange Ketten, die in der typischen Helix Struktur resultiert.

Einzelstränge sind dabei über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verknüpft. Jeder Einzelstrang besteht aus den Nukleotiden, welche die Bausteine der Nukleinsäuren sind. Jedes Nukleotid besteht aus einem Zucker, der D-Desoxyribose, einer organischen Base (Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin) und einem Phosphatrest. Durch Phosphatester-Brücken sind die Nukleotide miteinander verbunden. Durch wiederholtes verknüpfen der Phosphatester-Brücken vom C5' des Zuckers mit dem C3' Ende des anderen Nukleotids bzw. dem Zucker bilden sich lange Ketten. Als Vereinfachung werden die Nukleotide in der Literatur nur durch vier Buchstaben A, G, T und C welche sich aus den Basen ableiten, beschrieben. Die Nukleotide sind dabei in besonderer Form über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden. Die



Verknüpfung erfolgt jeweils nur zwischen Guanin und Cytosin, sowie Adenin und Thymin.. Ein Strang bindet sich also nur mit einem anderen, wenn dieser Komplementär ist, also die passende Sequenz besitzt.

### 2.6.2 DNA-Origami

Die Idee, DNA als Baumaterial für selbstassemblierte Strukturen zu verwenden, wurde von Nadrian Seeman 1982 ins Leben gerufen<sup>62</sup>. Durch die hohe Spezifität der Watson-Crick-Basenpaarung ist es möglich, einzelne DNA Stränge so miteinander zu verbinden, dass kleine Strukturen entstehen (Abb.2-13).

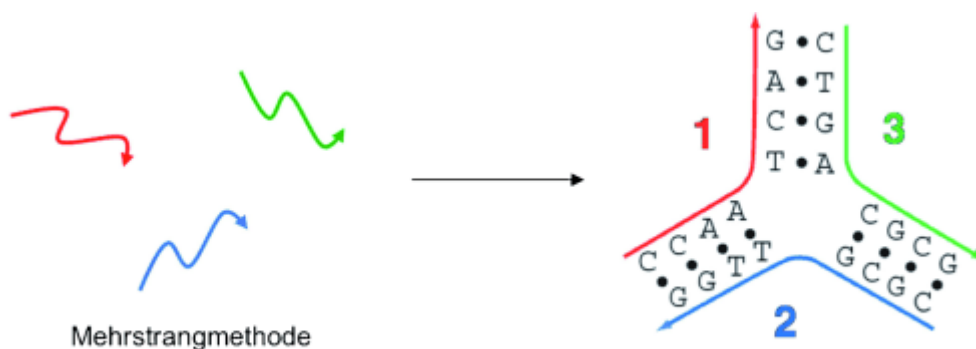


Abbildung 2-13: Das Prinzip der Mehrstrangmethode. Die Stränge sind jeweils komplementär zu den anderen, sodass durch die Watson-Crick-Basenpaarung kleine Strukturen entstehen können. Wiedergabe aus Lit.[<sup>63</sup>] mit Genehmigung von John Wiley and Sons.

Ein Nachteil dieser Methode ist die Limitierung auf kleine Strukturen. Um größere Strukturen zu erhalten müssen kleinere Strukturen über ihre sogenannten „sticky ends“ (dies sind Einzelstränge welche aus der Struktur überhängen) miteinander verbunden werden. Mit diesem Verfahren konnten komplexe Strukturen hergestellt werden <sup>64</sup>. Diese Arbeitsweise hat den Nachteil, dass jede Struktur die zum Aufbau einer Überstruktur verwendet wird, gereinigt werden muss. Außerdem muss das richtige stöchiometrische Verhältnis der Strukturen eingehalten werden. Diese und andere Punkte verkomplizieren den Herstellungsprozess. Die Fehleranfälligkeit für einen falschen Einbau, steigt auch mit der Größe und Komplexität der Struktur.

2006 stellte Paul Rothemund eine revolutionäre Methode zur gleichzeitigen Herstellung von Milliarden kleinen DNA-Strukturen vor <sup>22</sup>. Hierbei wird ein langer Gerüststrang, genannt „scaffold strand“, mithilfe von kleinen kurzen Hilfsträngen, den „staple strands“, in eine vordefinierte Form gefaltet (Abb.2-14).

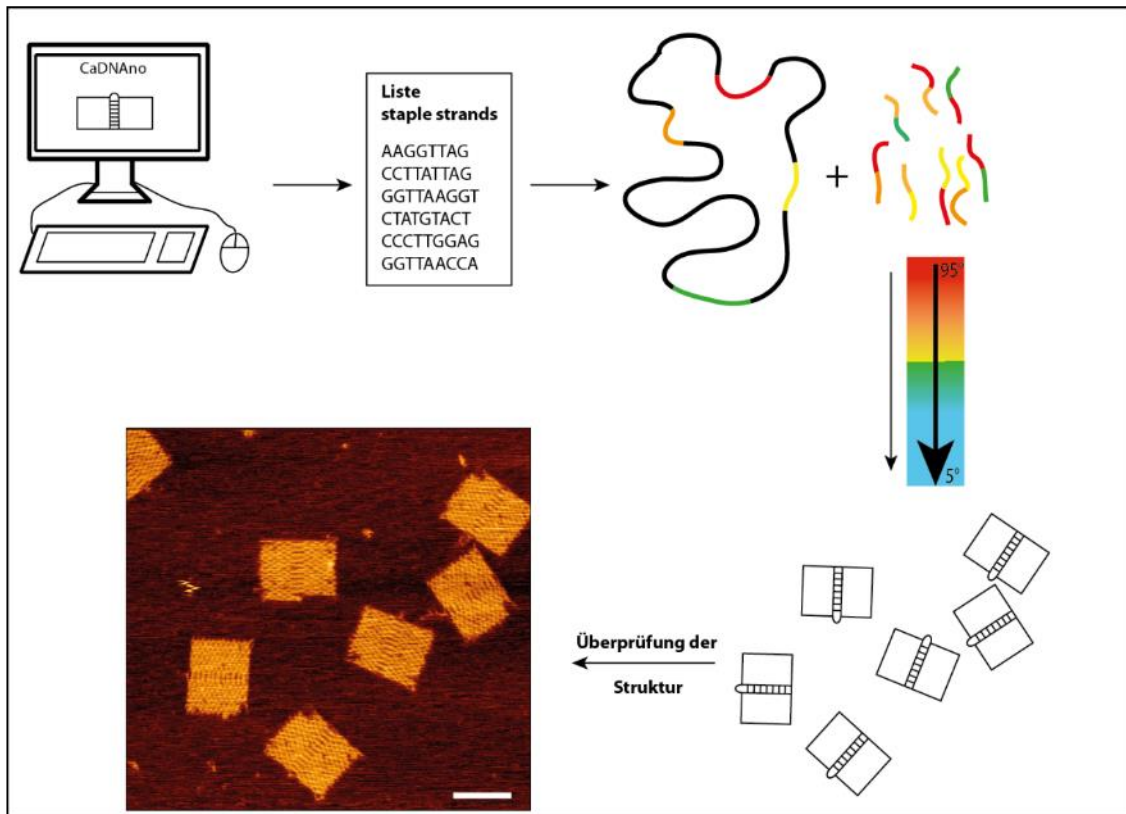


Abbildung 2-14: Die Herstellung der DNA-Origamis in der Übersicht. Im ersten Schritt wird über ein Computer Programm, das Origami designt. Die benötigten staple strands werden von dem Programm automatisch berechnet. Der Scaffold wird dann zusammen mit den staple strands und etwas Magnesiumchlorid auf bis zu 95 °C erhitzt und dann schrittweise wieder auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Die Überprüfung der gefalteten Strukturen erfolgt mittels Rasterkraftmikroskopie (siehe Material und Methoden).

Diese Technik nannte er DNA-Origami, nach dem Prinzip der japanischen Kunst des Papierfaltens. Die Faltungsstränge haben dabei eine Länge von bis zu 50 Basen wobei der Gerüststrang bis zu 8634 Basen beinhalten kann. Die Faltungsstränge werden im 30-fachen Überschuss dazugegeben, um Fehleinbauten zu verhindern. Durch modifizierte Faltungsstränge ist es möglich, unter anderem Biotine zur Immobilisierung, Farbstoffe oder Goldnanopartikel Nanometer genau auf dem DNA-Origami zu platzieren. Der große

Vorteil dieser Methode liegt in ihrer Handbarkeit. Der Gerüststrang, die Faltungsstränge und etwas Magnesiumchlorid werden zusammen auf eine bestimmte Temperatur erhitzt und abgekühlt. Im Abkühlungsprozess binden sich die Faltungsstränge komplementär zu der passenden Sequenz im Gerüststrang. Durch den Überschuss der Faltungstränge wird gewährleistet, dass eventuelle falsch eingebaute Faltungsstränge verdrängt werden und durch die richtigen ersetzt werden. Durch die Möglichkeit bspw. Farbstoffe einzubauen, kann auch von einem Steckbrett oder Lineal im Nanometer Bereich gesprochen werden<sup>65,66</sup>.

### 3. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten Materialien und Methoden näher beschrieben. In den ersten beiden Unterkapiteln werden die verschiedenen Mikroskopie-Techniken vorgestellt (konfokal und AFM). Unterkapitel 3.4 beinhaltet die DNA-Origami Strukturen. Als Nächstes werden die verwendeten Farbstoffe und die Immobilisierung der Proben beschrieben. Die zwei letzten Unterkapitel beinhalten die Goldnanopartikel und die ZMW-Vorbereitung.

#### 3.1 Konfokales Mikroskop

Für die fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurde ein selbst gebautes konfokales Mikroskop verwendet, welches auf einem inversen Mikroskop (IX71, Olympus) mit einem hohen NA<sup>3</sup> Öl-Immersion Objektiv (100x/NA 1.40, ULSAPO100XO, Olympus) basiert (siehe Abb. 3.1).

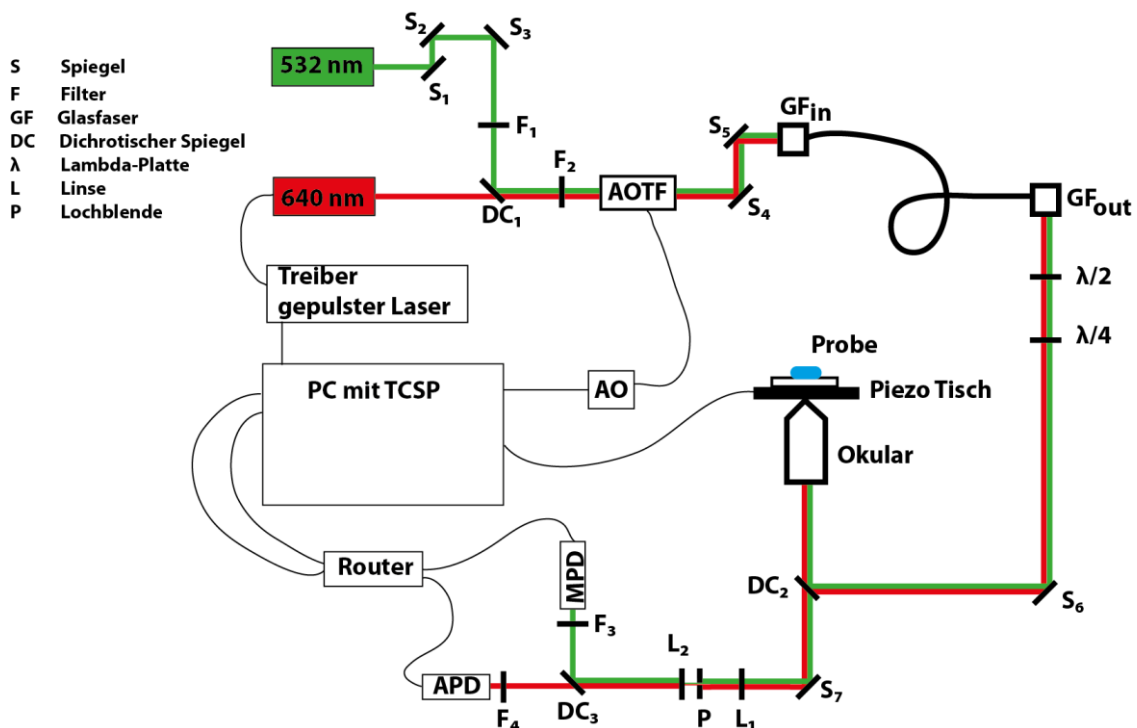


Abbildung 3-1: Schematischer Aufbau des konfokalen Mikroskops. Die beiden Laser passieren den AOTF, welcher die beiden Laser alterniert. Anschließend werden sie durch eine optische Faser geleitet, um einen Höhenabstand zu überwinden. Das Fluoreszenzsignal wird durch eine Lochblende geleitet und durch eine APD bzw. MPD detektiert und durch eine TCSPC-Karte registriert werden.

<sup>3</sup> NA: numerische Apertur

Für die Messungen wurde ein roter 80 MHz gepulster Laser (LDH-D-C-640, Picoquant) und ein grüner Dauerstrichlaser (Saphire LP 532, Coherent) verwendet. Die beiden Laser werden durch einen dichroitischen Strahlenteiler ( $DC_1$ ) zusammengeführt und treffen nach einem AOTF (akusto-optischer Kristall) auf eine Glasfaser, welche dazu dient das Strahlungsprofil aufzureinigen. Der AOTF sorgt für eine Alternierung der beiden Laserstrahlen (die Alternierungsfrequenz beträgt 10 Hz). Der AOTF wird durch eine analoge Ausgangskarte (AO) (PCI-6713, National Instrument) gesteuert. Die Polarisation des Anregungslichtes wird über eine  $\lambda/4$ -Platte (AQWP05M-600, Thorlabs) in zirkular polarisiertes Licht ausgerichtet, was auch den Vorteil bietet Polarisierungseffekte entgegenzuwirken. Der Laserstrahl wird anschließend über einen zweiten dichroitischen Strahlenteiler  $DC_2$  (Dualband z532/633, AHF) in das Objektiv eingekoppelt und auf die Probe fokussiert. Die Probe wird durch einen Piezo-Tisch (P-517.3CL, Physik Instrumente) über dem Objektiv bewegt und so ab gerastert. Das erhaltene Fluoreszenzlicht wird über das gleiche Objektiv gesammelt und gelangt auf eine konvexe Linse, welche das Fluoreszenzsignal auf eine Lochblende P (50  $\mu\text{m}$ , Linos) fokussiert.

Die Lochblende sorgt für eine Verringerung des Detektionsvolumens, da Moleküle, welche sich oberhalb oder unterhalb der Objektivbrennebene befinden, nicht detektiert werden. Durch einen dritten dichroitischen Strahlenteiler  $DC_3$  wird das Fluoreszenzsignal wieder in zwei Strahlen aufgeteilt. Diese passieren dann zwei Filter (Bandpass ET 700/75M, AHF und Razor Edge LP647, Semrock), bevor das rote Signal durch eine APD ( $\tau$ -SPAD 100, Picoquant bzw. für die FRET Messungen eine Perkin Elmer) und das grüne Signal durch eine MPD (Picoquant) detektiert und durch eine TCSPC<sup>4</sup>-Karte (SPC-830, Becker&Hickl) registriert werden.

---

<sup>4</sup> TCSPC: "time correlated single photon counting" oder Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung wird in Kapitel 3.2 beschrieben

### 3.2 Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

Die Messung der Fluoreszenzlebensdauer von einzelnen Farbstoffmolekülen, erfolgt über die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (im englischen TCSPC: "time correlated single photon counting"). Diese Methode basiert auf der Detektion von einzelnen Photonen, welche wiederholt und auf einer genauen Zeitskala registriert werden. Als Zeitgeber dient ein gepulster Laser. Dabei wird der Zeitunterschied zwischen dem Laserpuls und der Detektion des Photons gemessen (Abb.3-2).

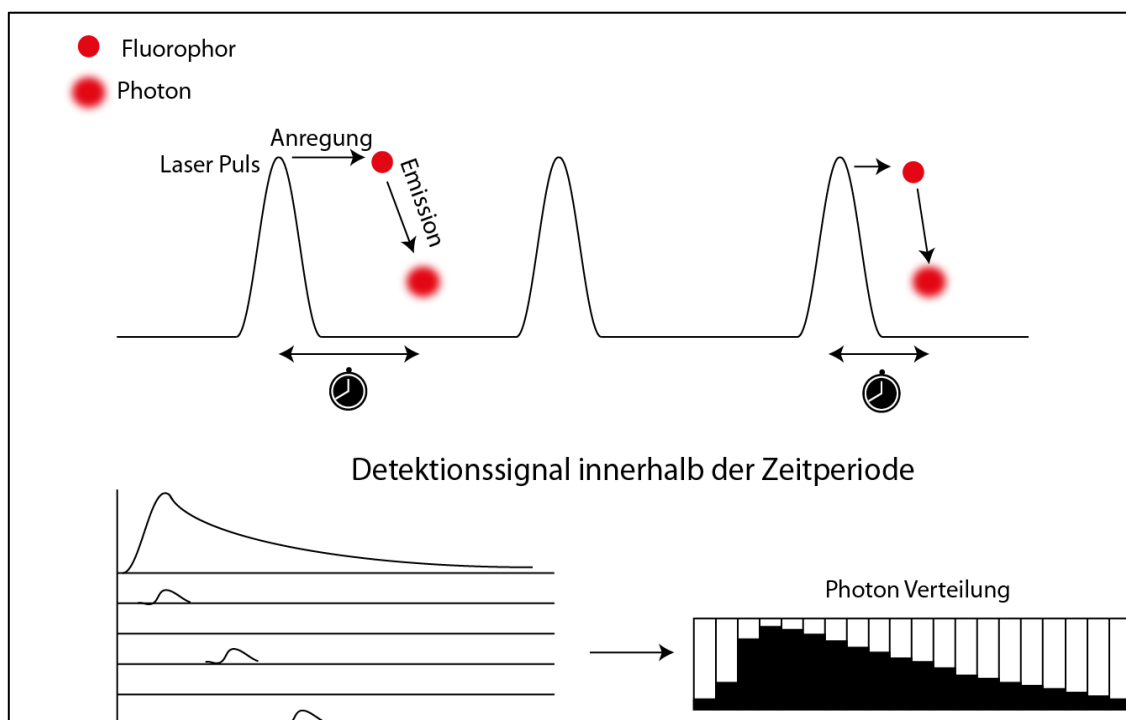


Abbildung 3-2: Das Prinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung. Ein gepulster Laser dient als Startpunkt und die Detektion des Photons als Stopp-Signal. Dies wird über eine bestimmte Zeitperiode aufgenommen, woraus die typische Verteilung der Fluoreszenzlebensdauer resultiert.

Die Fluoreszenzlebensdauer kann so durch die Anregung des Fluorophors mittels eines kurzen Laserpulses bestimmt werden. Der kurze Laserpuls startet die Zeitmessung und die Detektion des Photons stoppt die Zeitmessung. Dies wird solange wiederholt, bis der Farbstoff gebleichen ist. Die so gemessenen Zeiten aller detektierten Photonen werden dabei in einem Histogramm aufgezeichnet, woraus eine Fluoreszenzabklingkurve resultiert. Bei dieser Methode ist es notwendig, die Registrierung von mehr als einem Photon

pro Anregungspuls zu unterbinden. Durch die Totzeit der Elektronik und der Detektoren ist es in dieser Zeitspanne nicht möglich, Photonen zu detektieren. Die späteren Photonen würden dadurch nicht mit aufgezeichnet und die ersten Photonen würden im Histogramm bevorzugt, was zu einem "Pile-Up-Effekt" führt<sup>67</sup>. Dieser Effekt würde eine Verkürzung der durchschnittlichen Fluoreszenzlebenszeit hervorrufen. Die erhaltene monoexponentielle Abklingkurve würde zu einer biexponentiellen Kurve werden.

Die erhaltene Fluoreszenz-Abklingkurve eines Moleküls welche mit einem kurzen Laserpuls angeregt wurde beinhaltet auch die IRF<sup>5</sup>. Um die genaue Fluoreszenzlebensdauer zu bestimmen, ist eine Entfaltung der IRF von der Fluoreszenzabklingkurve erforderlich. Um die IRF zu bestimmen, wird die Reflexion des Lasers an dem Aluminium der ZMW gemessen. Da die Intensitäten unter Messbedingung unterschiedlich sind, müssen auch die IRFs bei diesen Intensitäten gemessen werden. Anschließend wird für jede Intensität der Fluoreszenzabklingkurve die passende IRF gewählt und entfaltet. Die Entfaltung wurde mithilfe der Software FluoFit (Picoquant) durchgeführt welcher folgende Formel zugrunde liegt:

$$I(t) = A_{scat} \cdot IRF(t) + \int_0^{\infty} IRF(t') \cdot A \cdot e^{\frac{t-t'}{\tau_{Fl}}} dt' \quad 3-1$$

hierbei beschreibt der Term  $A_{scat}$  die Amplitude der Lichtstreuung an dem ZMW bzw. den Goldnanopartikeln. Der zweite Teil der Gleichung beschreibt die Faltung aus der IRF und der Amplitude  $A$  der Fluoreszenzabklingkurve sowie der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{Fl}$ . Im Programm können zusätzliche Parameter eingestellt werden (siehe Tabelle 3.1).

---

<sup>5</sup> IRF: Instrument response function - Instrumentantwortfunktion

Tabelle 3-1: Parameter für die Entfaltung mit der Software FluoFit

Parameter	Beschreibung	Wert	Startwert
<b>A</b>	Amplitude	Variabel, >0	1000
<b><math>\tau</math></b>	Fluoreszenzlebensdauer	Variabel	1
<b>Bkgr<sub>IRF</sub></b>	Untergrund der IRF	Wird manuell festgelegt	-
<b>Bkgr<sub>Dec</sub></b>	Untergrund der Abklingkurve	Variabel, >0	0
<b>Shift<sub>IRF</sub></b>	Zeitverschiebung zwischen IRF und Abklingkurve	Wird global gefittet, wird wenn nötig einzeln korrigiert	0
<b>A<sub>Scat</sub></b>	Lichtstreuungsamplitude	Variabel, >0	0
<b>Period<sub>rep</sub></b>	Zeitperiode zwischen zwei aufeinander folgenden Laserpulsen	Festgesetzt auf 12,5 ns	12,5



### 3.3 Extinktionsmessung

Die Konzentration der DNA-Origamis sowie der Goldnanopartikel wurden mithilfe eines UV/Vis-Spektrometers bestimmt (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). Das Gerät misst dabei die Durchlässigkeit der zu untersuchenden Materie. Die Abhängigkeit der Extinktion  $E_\lambda$  von der Konzentration  $c$  einer Lösung wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben:

$$E_\lambda = \lg\left(\frac{I_0}{I_z}\right) = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad 3-2$$

Das Gesetz beschreibt sämtliche Prozesse<sup>6</sup>, welche die Abschwächung einer Strahlung durch ein Medium beschreibt.  $I_0$  ist die einfallende Strahlung und  $I_z$  die austretende Strahlung. Der Term  $\varepsilon_\lambda$  wird als molarer dekadischer Absorptionskoeffizient bezeichnet und ist eine Stoffeigenschaft. Er ist abhängig von der Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes<sup>68</sup>.

---

<sup>6</sup> Bei zu hohen Konzentrationen gilt das Gesetz nicht mehr

### 3.4 Rasterkraftmikroskopie (AFM – Atomic Force Microscopy)

Ein prominenter Vertreter zur Überprüfung von DNA-Origami-Strukturen, stellt das Rasterkraftmikroskop (AFM) dar. In dieser Arbeit wurde ein NanoWizard® 3 ultra AFM der Firma JPK Instruments AG (Berlin) verwendet. Das Prinzip der Arbeitsweise eines AFM wird in Abb.3-3 ersichtlich. Eine kleine Spitze, welche sich an einer Blattfeder (auch

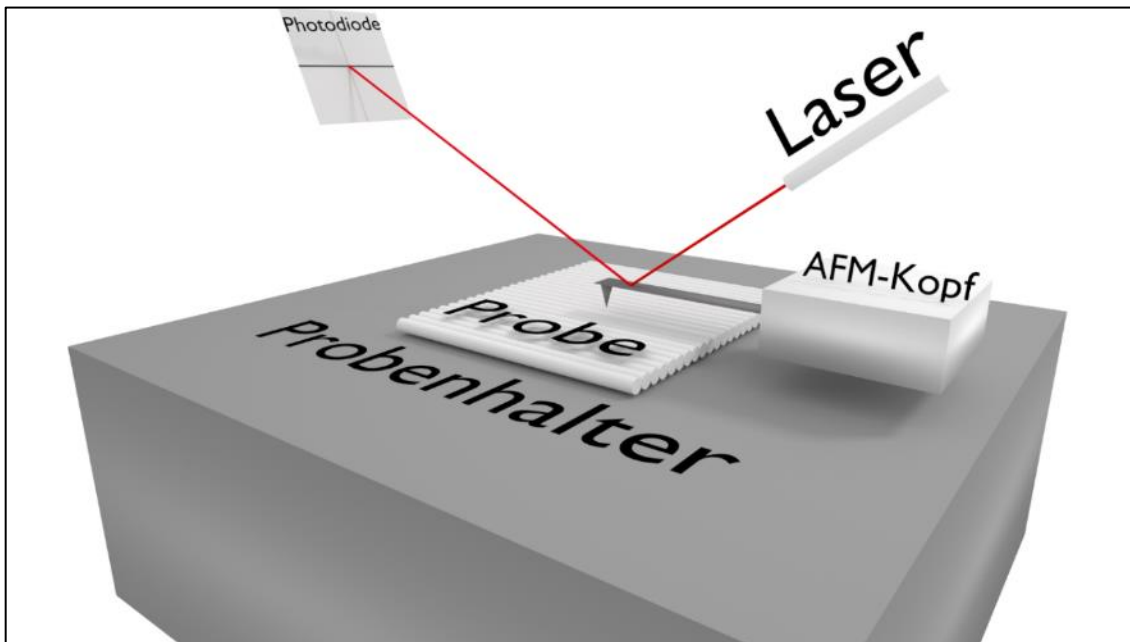


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops. Ein Laser wird auf die reflektierende Rückseite einer Blattfeder gerichtet, an dessen Ende sich eine kleine Spitze befindet. Der Cantilever wird dann rasterartig über die Probe gefahren. Die Auslenkungen des Cantilevers werden mittels des Lasers, welcher auf eine Vierquadrantenphotodiode fokussiert ist, detektiert.

Cantilever genannt) befindet, wird rasterartig über die Probe gefahren<sup>7</sup>. Um die Auslenkung des Cantilevers zu bestimmen, wird ein Laser auf die reflektierende Rückseite fokussiert.

Durch die Wechselwirkung der Probe mit der Spitze verbiegt sich der Cantilever. Diese Verformung wird durch eine Vierquadrantenphotodiode registriert. Diese Änderung wird dann dazu verwendet ein Bild der Oberfläche zu generieren.

---

<sup>7</sup> Es gibt zwei unterschiedliche Varianten für das Abrastern. Bei einem wird der Tisch auf dem die Probe befestigt ist bewegt und bei der anderen Methode wird der AFM-Kopf bewegt.

### 3.4.1 AC-Mode / Tapping Mode (Alternate Current Mode)<sup>8</sup>

Die Untersuchung von biologischen Proben gestaltet sich als schwierig, da die Wechselwirkung mit der Spitze oft zu einer Zerstörung der Probe führte. 1987 wurde ein neuer dynamischer Abbildungsmodus eingeführt, welcher die Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze minimierte <sup>69</sup>. Der Cantilever wird hierbei nahe seiner Resonanzfrequenz zum Schwingen gebracht. Bei diesem Modus steht die Spitze nicht in Kontakt mit der Probe ("Non-Contact Mode"), sondern oszilliert bei einer kleinen Amplitude oberhalb der zu untersuchenden Probe. Die Bestimmung der Interaktion zwischen Probe und Spitze erfolgt durch schwache van der Waals Wechselwirkungen. Um die Auflösung des dynamischen Modus zu erhöhen, wurde eine Kombination aus Contact und Non-Contact vorgestellt <sup>70</sup>. Hierbei handelt es sich auch um einen dynamischen Modus, nur mit dem Unterschied, dass die Spitze im unteren Umkehrpunkt der Schwingung die Probe berührt. Die Schwingungsamplitude ist zudem sehr viel höher als im non contact mode (20-100 nm). Die Anregung des Cantilevers wird vorher durch die Software festgelegt. Die Frequenz der Amplitude wird dabei im Bereich von 0-500 kHz aufgetragen. Die Anregung wird dann kurz vor dem Resonanzpeak, der Eigenresonanzfrequenz des Cantilevers, festgelegt.

Neben den oben genannten Eigenschaften eignet sich dieser Modus nicht nur hervorragend für biologische Proben, er besitzt auch die Möglichkeit in Flüssigkeiten zu messen <sup>71</sup>. Durch die Flüssigkeit wird die Resonanzfrequenz des Cantilevers verringert, was zu einer langsameren Scan Geschwindigkeit führt. Das Abbilden in Flüssigkeit reduziert dabei die Kräfte auf die Proben und ermöglicht so ein Arbeiten unter natürlichen Bedingungen.

---

<sup>8</sup> Der Begriff Tapping Mode ist ein eingetragenes Warenzeichen der Firma Veeco / Digital Instruments. Andere Unternehmen wie hier JPK verwenden den Begriff AC-Mode. Beide Begriffe beschreiben in der Literatur jedoch den gleichen Modus.

### 3.4.2 Vorbereitung und Messung der DNA-Origami mit dem AFM

Alle Proben wurden in TAE-Puffer (40 mM Tris, 2 mM EDTA und 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>) gemessen. Dafür wurde ein frisches abgezogenes MICA-Plättchen (Qualität V1, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit 10 mM Nickelchlorid-Lösung für 2 Minuten inkubiert, danach mit MilliQ-Wasser gewaschen und mit Druckluft getrocknet. Die DNA-Origamis (1 µl Probe in 10 µl TAE-Puffer) wurden auf die MICA-Oberflächen gegeben und für 2 Minuten inkubiert. Danach wurde die Oberfläche fünfmal mit TAE Puffer gewaschen um Origamis, die nicht angebunden haben, wegzuspülen. Anschließend wurde die Oberfläche mit TAE Puffer vollständig bedeckt.

Die Bilder wurden im AC-Modus aufgenommen. Für hochauflösende Aufnahmen wurden ultra short Cantilever (NanoWorld, 330 khz und 0.3 n/m) verwendet. Die Auflösung für die Aufnahme betrug 512 x 512 Pixel. Die Kraft mit welcher der Cantilever auf die Probe wirkt, wurde auf ein Minimum beschränkt um die Probe zu schonen.

### 3.5 Herstellung der DNA-Origami Strukturen

Als Scaffold diente das Genom des Bakteriophagen M13Mp18. In der Tabelle 3-2. befinden sich die unterschiedlichen Längen der verwendeten Scaffolds.

Tabelle 3-2: Übersicht der verwendeten Scaffolds zur Herstellung der verwendeten DNA-Origami-Strukturen

DNA-Origami	Länge des Scaffolds in Basen
Disk	8634
Antenne	8064
NRO	7249

Die modifizierten und unmodifizierten Staple-Stränge wurden von den Firmen MWG, IBA und Biomers bezogen. Die Staples wurden in einem 20-fachen Überschuss zum Scaffold gegeben. Durch den Überschuss werden eventuelle Fehleinbauten korrigiert, was in einer Erhöhung der korrekt gefalteten Strukturen resultiert. Die Faltung wurde in einem Thermocycler (Eppendorf) durchgeführt. Dabei wird das Gemisch bestehend aus Scaffold, Staples und Puffer erhitzt und anschließend kontinuierlich auf 4 °C runtergekühlt. Die Intervalle sowie die Temperatur hängen davon ab wie komplex eine Struktur

ist. Bei den 2-dimensionalen Rechteck-Origami (NRO) dauert ein Faltungsprozess ca. 2 Stunden, wo hingegen für die Nanodisk 3 Tage veranschlagt werden. Die genauen Faltungsprogramme für die jeweiligen hier verwendeten Strukturen und die Zusammensetzung der Puffer befinden sich im Anhang. Nach dem Faltungsprozess ist es notwendig, die DNA-Origami-Strukturen von den überschüssigen Staples zu reinigen. Hierzu wurde das Reaktionsgemisch in Zentrifugalfilter überführt (Amicon Ultra 0.5 ml, 100 K) und dreimal mit 400  $\mu$ l TAE-Puffer bei 15000 rcf zentrifugiert. Danach wurde der Filter mit der Öffnung nach unten in ein neues Zentrifugegefäß überführt und für 3 Minuten bei 3000 rcf zentrifugiert, um die Origamis zurückzuerhalten. Das Zentrifugieren fand bei einer Temperatur von 4 °C statt.

### 3.6 DNA-Origami-Nano-Adapter

Für die DNA-Origami-Nano-Adapter wurde ein neues Design in Form einer 3-dimensionalen Scheibe, im weiteren als Disk bezeichnet, konstruiert <sup>72</sup>. Diese besteht dabei aus einer Anordnung von sechs Helix Bündeln (6 HB). Durch die Länge der Helices ergibt sich eine elliptische Form und das Origami wird stabilisiert (siehe Abb.3-4).

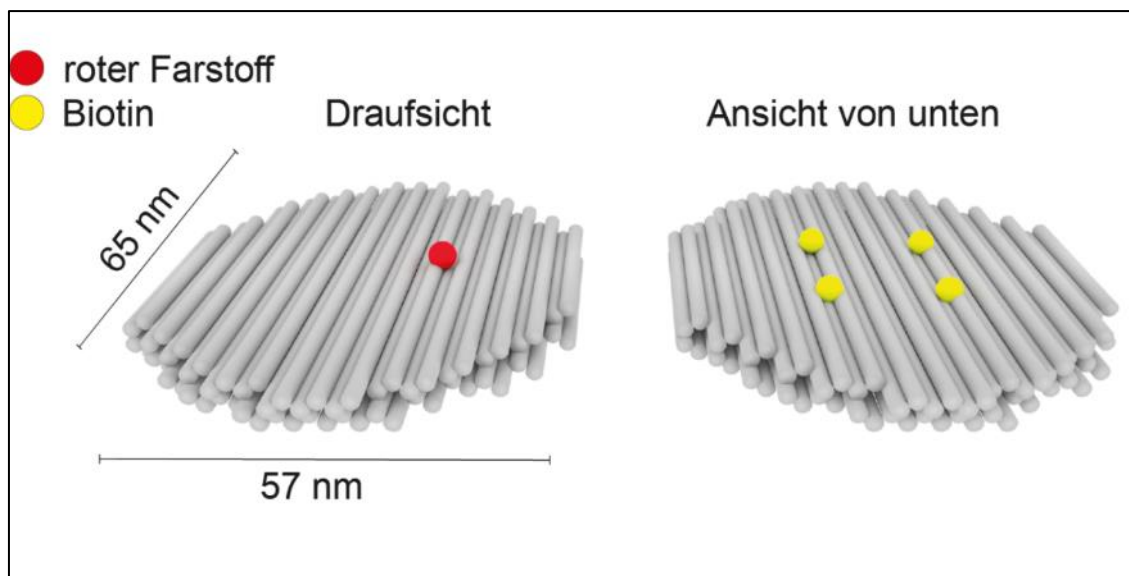


Abbildung 3-4: Abgebildet ist die DNA-Origami-Nanodisk, mit der Draufsicht und der Ansicht von unten. Die rote Kugel stellt den Farbstoff ATTO 647N dar und die gelben Kugeln die Biotin-Moleküle. Diese sind mittig angeordnet um ein optimales anbinden in der Nanoapertur zu gewährleisten. Die Disk ist ungefähr 65 nm lang und 57 nm breit. Der Aufbau besteht aus 6 Helix Bündeln die aneinandergereiht sind. Dadurch ergibt sich die elliptische Form und gleichzeitig eine starre Struktur.

Durch die Form ergibt sich eine Länge von 65 nm und einer Breite von 57 nm. Die Biotin-Moleküle zum Anbinden an die NeutrAvidin-Oberfläche sind mittig platziert, um zu gewährleisten, dass die Nanodisk gerade und irreversibel in der Nanoapertur bindet.

Als Alternative zur Disk wurde ein rechteckiges DNA-Origami (NRO) verwendet <sup>65</sup> (siehe Abb. 3-5). Dieses hat eine Länge von 100 nm und eine Breite von 70 nm. Im Gegensatz

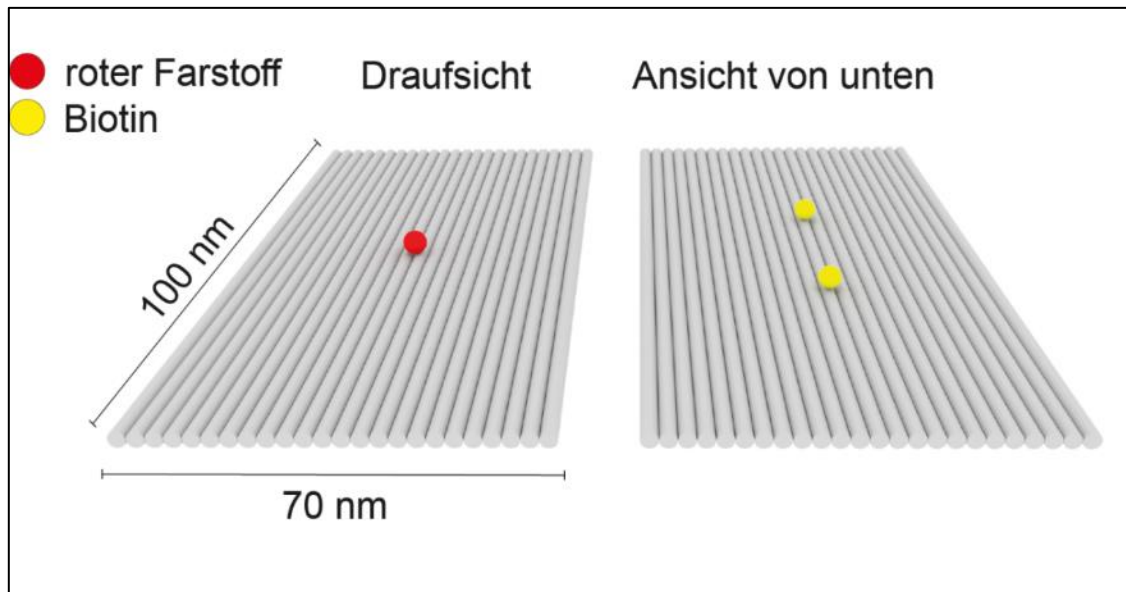


Abbildung 3-5: Abgebildet ist das rechteckige DNA-Origami. Es besteht aus 23 verknüpften Helices. Die 2 Biotin-Moleküle sind mittig platziert. Im Zentrum der Oberseite ist der Farbstoff ATTO 647N platziert.

zu den ursprünglich 6 Biotin-Molekülen wurden hier nur 2 Biotin-Moleküle mittig platziert. Dies soll eine Bindung von mehreren Origamis in den Aperturen verhindern. Das NRO besteht aus 23 verknüpften Helices. Auf der Vorderseite ist mittig der Farbstoff ATTO 647N angebracht.

### 3.7 DNA-Origami-Nanoantenne

Für die FRET-Messungen wurde eine DNA-Origami-Nanoantenne <sup>48,49</sup> verwendet (siehe Abb.3-6). Diese besteht aus insgesamt 66 DNA Helices.

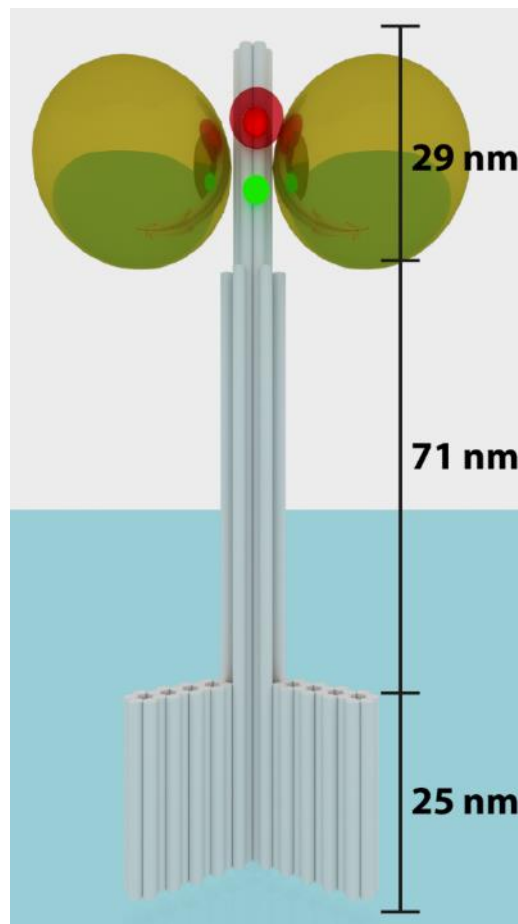


Abbildung 3-6: Abgebildet ist die DNA-Origami-Nanoantenne. Die y-förmige Basis hat eine Höhe von ca. 25 nm. Um die 6 Helix Bündel in der Mitte sind 6 weitere Helices angeordnet, welche eine Höhe von 96 nm haben. Die mittleren 6 Helices haben eine Gesamthöhe von 125 nm. Am oberen Teil befinden sich jeweils auch die Anbindestellen für die Goldnanopartikel sowie die Farbstoffe.

In der Mitte befindet sich ein 6-Helix-Bündel mit einer Höhe von 125 nm. Um dieses 6-Helix-Bündel sind die anderen Helices platziert. Die äußeren Helices, welche eine y-förmige Grundfläche besitzen, haben eine Länge von ca. 25 nm. Die mittleren Helices haben eine Länge von 95 nm und werden als 12-Helix-Bundle bezeichnet. An der Unterseite der Grundfläche befinden sich acht Biotin-Moleküle. Auf der linken sowie auf der rechten Seite des 6-Helix-Bundles befinden sich jeweils drei Anbindestellen für die

Goldnanopartikel. Am 6-Helix-Bundle sind zwei Farbstoffmoleküle angeordnet. Der Abstand zwischen Goldnanopartikel und Nanoantenne ist abhängig von der Bindungsart. Hier ergeben sich zwei Möglichkeiten. Bei der einen Variante ist die Funktionalisierung der Nanopartikel so designt, dass das 3'-Ende von diesem weg zeigt. Bei dem Origami ist der DNA-Strang, an welchem der Partikel anbinden soll, am 3'-Ende soweit verlängert, dass dieses von der Struktur weg zeigt. Somit kann eine Bindung zwischen Origami und Nanopartikel erfolgen. ("Scheren-Konfiguration"). In der zweiten Variante, welche Zipper genannt wird (nach dem Reißverschlussprinzip), zeigt beim Partikel auch das 5'-Ende weg. Durch diese Bindungsart werden die Partikel starrer an das Origami gebunden und der Abstand zu den Farbstoffen verringert sich (siehe Abb. 3-7).

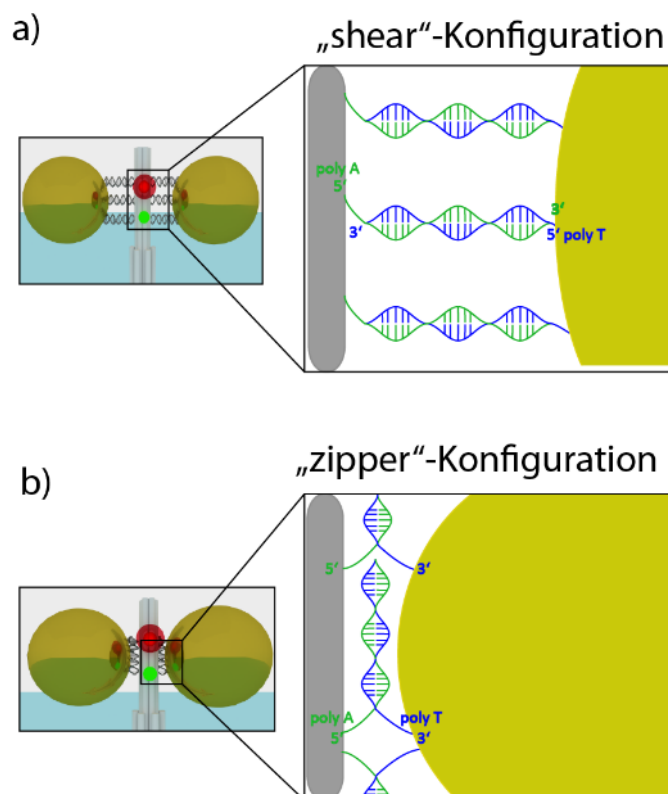


Abbildung 3-7: Abgebildet ist die Nanoantenne mit den zwei verschiedenen Bindungsmodi. a) in diesem Fall zeigt das 3'-Ende weg vom Partikel. Somit ergibt sich eine sogenannte Scheren-Konfiguration („shear“). b) hier zeigt das 5'-Ende vom Partikel weg und es ergibt eine Reißverschluss Konfiguration („zipper“), verändert nach <sup>49</sup>.



### 3.8 Farbstoffe

Für die FRET Messungen wurden zwei unterschiedliche Varianten der DNA-Origami-Nanoantenne designt, welche sich nur im Abstand der Farbstoffmoleküle unterscheiden. Bei der Probe, welche eine hohe FRET-Effizienz ( $E = 0.8$ ) aufweist, beträgt der Abstand zwischen den Farbstoffen 10 Basenpaare, was einem Abstand von 3.4 nm entspricht. Der ATTO 532 fungiert bei dieser Variante als Donor und der ATTO 647N als Akzeptor. Bei der anderen Nanoantenne beträgt der Abstand der Farbstoffe ca. 21 Basenpaaren, was einem Abstand von 7.14 nm entspricht. Die resultierende FRET-Effizienz ist hier geringer ( $E = 0.36$ ). Als Donor-Farbstoff wurde hier der Cy3B verwendet. Die Strukturen der Farbstoffe, sowie die Absorptions- und Emissionsspektren sind in Abbildung 3-8 und 3-9 dargestellt.

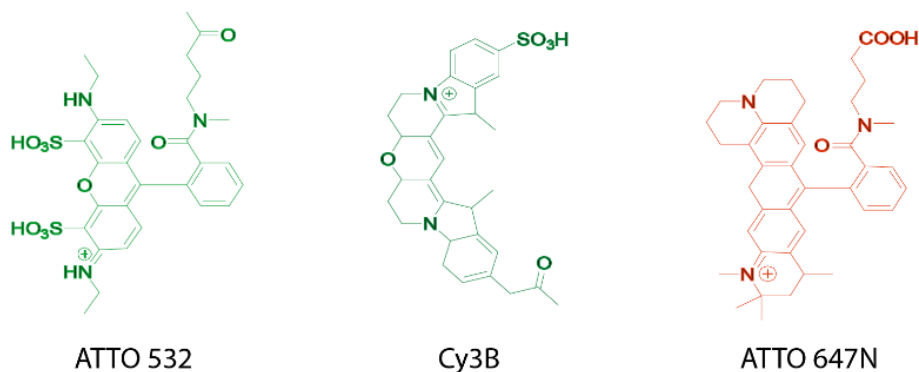


Abbildung 3-8: Die chemischen Strukturen der verwendeten Farbstoffe ATTO 532, Cy3B und ATTO 647N.

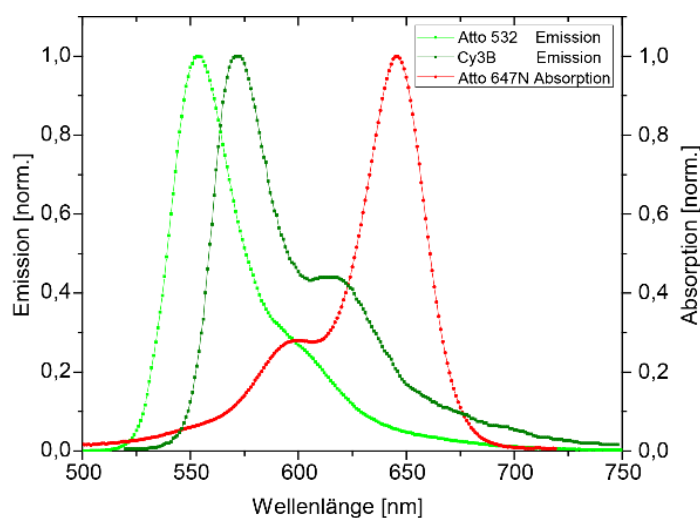


Abbildung 3-9: Dargestellt sind die Emissionsspektren von ATTO 532 und Cy3B und das Absorptionsspektrum von ATTO 647N.

### 3.9 Vorbereitung der Oberflächen für die Immobilisierung der DNA-Nanoantenne

Die Anbindung der DNA-Origami-Strukturen erfolgt über eine BSA-Biotin-NeutrAvidin-Bindung. Die NeutrAvidin-Biotin-Bindung zählt mit einer Dissoziationskonstanten von  $10^{-10}$  M zu den stärksten nicht-kovalenten Bindungen. Die DNA-Nanoantenne besitzt an ihrer Basis 8 Biotin-Moleküle, die eine Bindung mit NeutrAvidin eingehen können. Die Vorbereitung der funktionalisierten Oberfläche erfolgte in kleinen Kammern, den sogenannten LabTeks (Borsilikat, 8 Kammern, 1.5, Thermo Scientific Nunc, 155411). Im ersten Schritt wurden die Kammern mit einer 1 M KOH-Lösung versetzt, um Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurden diese mit MilliQ-Wasser gespült. Für die Funktionalisierung wurden 300  $\mu$ l (1 mg/ml) einer BSA-Lösung (BSA, 7906-10G, Sigma Aldrich) mit 100  $\mu$ l (1 mg/ml) einer BSA-Biotin-Lösung (A8549-10 MGMG, Sigma Aldrich) gemischt und in die Kammern gegeben. Nach 4 Stunden bei Raumtemperatur bzw. über Nacht im Kühlschrank wurden die Kammern 3-mal mit TAE-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 100  $\mu$ l einer NeutrAvidin-Lösung (NeutrAvidin®, Sigma Aldrich) mit einer Konzentration von 1 mg / ml in die Kammern gegeben. Nach einer halben Stunde wurden die Kammern erneut gewaschen, um ungebundenes NeutrAvidin zu entfernen. Anschließend wurde die Nanoantenne hinzugegeben.

Die Anbindung wurde mithilfe des konfokalen Mikroskops überprüft. Bei einer ausreichenden Belegung wurden die Kammern erneut mit Puffer gewaschen und anschließend bedeckt (siehe Abb.3-10).

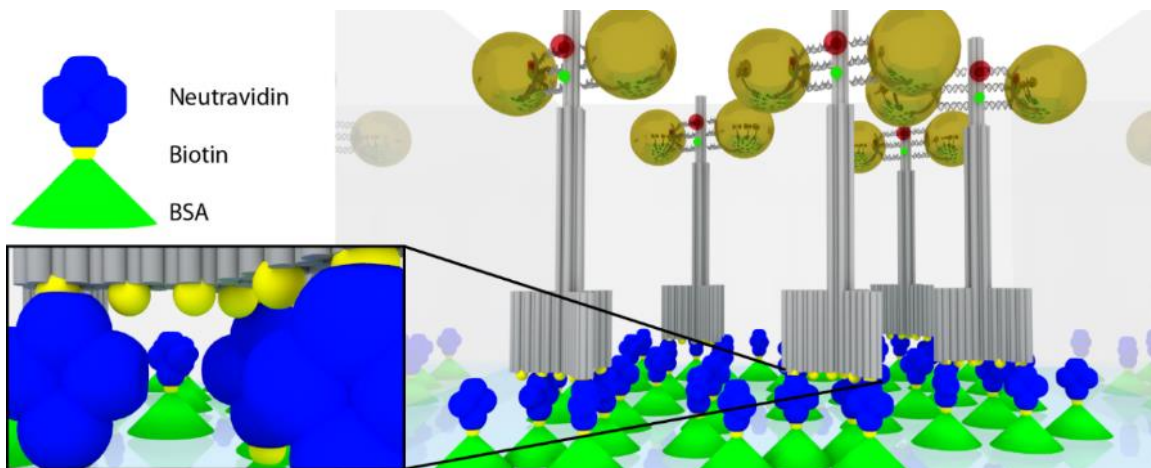


Abbildung 3-10: Die Funktionalisierung der Oberfläche, um eine Anbindung der Nanoantenne zu gewährleisten. Die Oberfläche ist durch BSA-Biotin passiviert. Dies verhindert eine unspezifische Anbindung der Nanoantenne an die Glasoberfläche. Das NeutrAvidin mit seinen 4 Bindungstaschen ermöglicht eine Anbindung an das Biotin und ermöglicht gleichzeitig die Anbindung der Nanoantennen, welche ebenfalls mit Biotin funktionalisiert sind.

### 3.10. Goldnanopartikel

Die Goldnanopartikel wurden von der Firma BBI Solutions bezogen. Für die FRET-Messungen wurden Nanopartikel mit einem Durchmesser von 20, 40 bzw. 80 nm verwendet. Die Absorptionsspektren sind in Abb. 3-11 abgebildet.

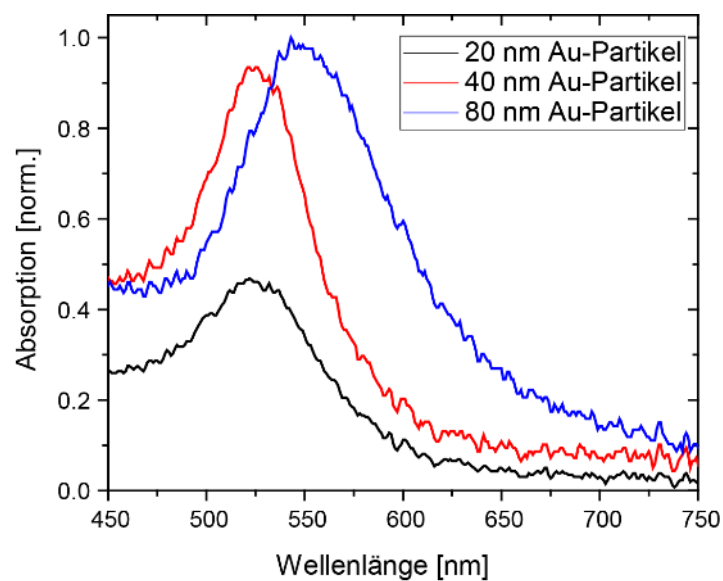


Abbildung 3-11: Aufgetragen ist die normierte Absorption der Nanopartikel von 20, 40 und 80 nm im Wellenlängenbereich von 450 - 750 nm.

In der Abbildung ist zu erkennen, dass je nach Größe der Partikel eine unterschiedliche Absorption resultiert. Die Absorptionsmaxima sind in Tabelle 3-3 aufgelistet.

Tabelle 3-3: Partikelgrößen mit den dazugehörigen Absorptionsmaxima

Partikelgröße [nm]	Wellenlänge bei max. Absorption [nm]
20	522
40	524
80	543

### 3.11 Funktionalisierung der Goldnanopartikel

Um die Goldnanopartikel spezifisch an die DNA-Nanoantenne zu binden wurden diese vorher mit Oligos<sup>9</sup> (3'Thiol-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT-5') (Ella Biotech GmbH) funktionalisiert<sup>49</sup>. Es wurde ein verändertes Protokoll nach Mirkin verwendet<sup>73</sup>. Die gesamte Funktionalisierungsprozedur wurde unter ständigem Rühren durchgeführt (VARIO-MAG®). 2 ml der Nanopartikel-Lösung wurden mit 20 µl Tween20 (10 %, Polysorbat 20, Alfa Aesar) versetzt und für 15 Minuten gerührt. Anschließend wurden 20 µl eines Kaliumphosphatpuffers (eine 4:5 Mischung von P8709/P8584, Sigma Aldrich) hinzugefügt und 15 Minuten gewartet. Die Oligos wurden in einer Konzentration von 50 nM hinzugegeben (die genauen Mengen für die jeweiligen Partikelgrößen befinden sich am Anhang). Die gesamte Mischung wurde über Nacht gerührt. Die Lösung wurde dann auf 40 °C erhitzt und nach 30 Minuten wurde schrittweise die Salzkonzentration (1xPBS mit 3.3 M NaCl) auf insgesamt 750 mM erhöht. Die Reinigung erfolgte durch eine 1:1 Verdünnung der Lösung mit einem PBS Puffer (1x PBS, 10 mM NaCl, 2.11 mM P8709, 2.89 mM P8584, 0.01 % Tween20, 1 mM EDTA) und anschließend zentrifugieren bei 2800 rcf für 20 Minuten bei 20 °C. Der Überstand wurde verworfen und die Lösung anschließend wieder mit PBS-Puffer versetzt und erneut zentrifugiert. Diese Prozedur wurde so oft wiederholt, bis durch eine Messung der Konzentration der Oligos des Überstandes im Nanodrop keine Oligos mehr nachweisbar waren. Diese Schritte sind zwingend notwendig, um die Bindung von noch in Lösungen befindlichen Oligos an die Nanoantenne zu

---

<sup>9</sup> kurze einzelsträngige DNA-Sequenzen werden als Oligonukleotide (kurz: Oligos) bezeichnet

unterbinden. Die fertigen funktionalisierten Goldnanopartikel wurden dann soweit mit einem TE-Puffer (1x TE, 300 mM NaCl und 12 mM MgCl<sub>2</sub>) verdünnt, um eine Absorption von 0.1-0.3 im Nanodrop zu erhalten. Die Goldnanopartikel wurden anschließend auf die LabTek-Kammern gegeben, in der die Nanoantenne bereits immobilisiert war. Die Lösung wurde anschließend über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Bei einer ausreichenden Belegung, durch Überprüfung mittels der Konfokal-Mikroskopie, wurden die Kammern mit TE-Puffer (1x TE, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl) gewaschen und für die Messungen mit dem Puffer bedeckt, um ein austrocknen zu verhindern.

### 3.12 ZMW Vorbereitung

Für die Messungen wurden ZMWs der Firma Pacific Biosciences® verwendet. Ein 9 x 9 mm großer Chip, welcher die ZMWs beinhaltet, ist auf einem Objektträger befestigt (siehe Abb.3-12). Es stehen insgesamt 6 verschiedene Durchmesser von ~80 – ~150 nm zur Verfügung. Für jede Größe beinhaltet der Chip 3 Felder. Jeder dieser Panels besitzt ~3000 ZMWs. Der Abstand zwischen den Feldern beträgt vertikal 1 µm und horizontal 4 µm. Der Chip bietet zusätzlich noch 6 Felder mit einem Durchmesser von ~200 nm.

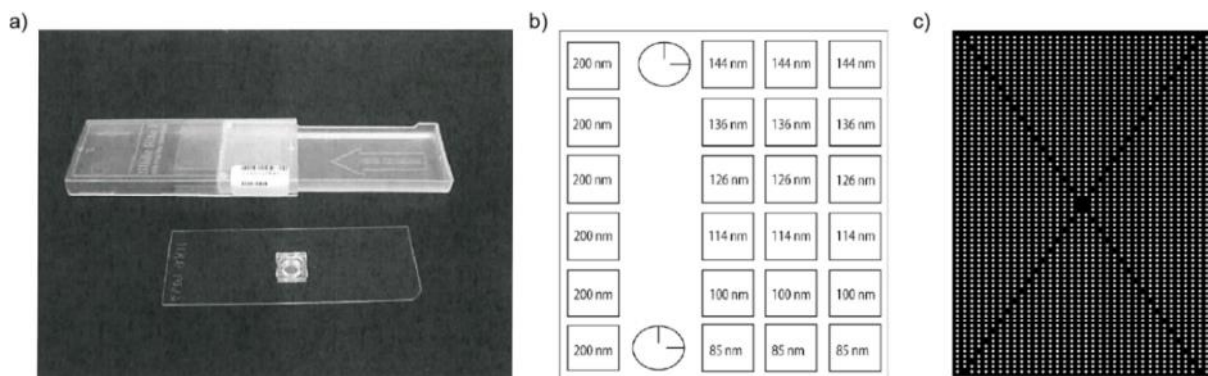


Abbildung 3-12: Dargestellt ist der Chip, welcher auf einem Glas Slide befestigt ist. b) Darstellung des Chip Layouts. Jeder Bereich mit den unterschiedlichen Durchmessern von 85 nm - 200 nm besitzt in etwa 3000 ZMWs. c) Beispiel eines Bereiches mit ZMWs [Produktdatenblatt Pacific Biosciences].

Der Boden der ZMWs ist bereits mit PEG-Biotin funktionalisiert. Dies bietet die Möglichkeit über eine NeutrAvidin-Biotin Bindung Moleküle an die Glasoberfläche zu immobilisieren. Um eine unspezifische Bindung an den Aluminiumwänden zu verhindern, sind

diese mit Polyphosphonaten passiviert <sup>17,42</sup> (Produktdatenblatt: non Commercial Zero-Mode Waveguide Arrays 2011). Um die DNA-Nanoadapter zu immobilisieren wurde der Chip zweimal mit MOPS Puffer (50 mM MOPS, 75 mM Kaliumacetat und 12.5 mM Magnesiumchlorid) gewaschen. Anschließend wurde der Chip mit 40 µl einer NeutrAvidin-Lösung (1 mg / ml) für 30 Minuten versetzt. Das nichtgebundene NeutrAvidin wurde durch spülen mit Puffer entfernt. Anschließend wurden die Nanoadapter pur in die ZMW gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Für die Messungen wurde der Chip dreimal mit MOPS gewaschen und bedeckt. Die gleiche Vorgehensweise wurde auch für die DNA-Origami-Nanodisk verwendet mit dem Unterschied, dass diese vorher verdünnt wurden und bei einer ausreichenden Belegung für die Messung vorbereitet wurden. Da die Disk von den Dimensionen her kleiner als das NRO ist, sollte durch diesen Schritt die Doppel- bzw. für die größeren Durchmesser der ZMW sogar eine mögliche dreifache Belegung unterbunden werden.

## 4. Ergebnisse und Diskussionen

Im ersten Unterkapitel werden die Ergebnisse der Beladung von den DNA-Origami-Nanoadaptoren besprochen und diskutiert. Das zweite Unterkapitel beinhaltet die Ergebnisse und Diskussion der FRET-Werte im Hotspot der DNA-Origami-Nanoantenne.

### 4.1 Positionierung und Beladung von Einzelmolekülen in ZMWs mit DNA-Origami-Nanoadaptoren

#### 4.1.1 AFM-Aufnahmen der DNA-Origami-Nanoadapter

Die verwendeten DNA-Origami-Nanoadapter wurden wie in Kapitel 3.5 beschrieben hergestellt und gereinigt. Ihre korrekte Faltung wurde wie in Kapitel 3.4 beschrieben mithilfe eines AFM überprüft. Abbildung 4-1 zeigt die Aufnahme der rechteckigen DNA-Origamis (NRO) sowie von der DNA-Origami-Nanodisk (ND). Im ersten Schritt wurde eine Übersichtsmessung durchgeführt. Dies dient dazu einen Überblick über die Anzahl von korrekt gefalteten Strukturen zu erhalten. Die Übersichtsbilder zeigen, dass die Faltung der meisten Strukturen korrekt verlaufen ist. Durch den Einfluss des Cantilevers und der Messparameter kann es vorkommen, dass einige Strukturen zerstört werden, wie oben auf den Übersichtsbildern zu erkennen ist. Durch die richtige Einstellung der Messparameter im Laufe der Messung kann dies verringert werden <sup>74</sup>. Die kleinen Ausschnitte zeigen eine Vergrößerung der Strukturen. Hierfür wurde der zu messende Bereich ausgewählt und nochmals gescannt. Dies resultiert in einer höheren Auflösung. Bei dem rechteckigen DNA-Origami ist sehr deutlich die Wabenstruktur zu erkennen. Da es sich bei der DNA-Origami-Nanodisk um eine dreidimensionale Struktur handelt, ist es schwierig die Struktur hochauflösend darzustellen. Insgesamt zeigen die AFM-Aufnahmen korrekte Strukturen, die für die Messungen verwendet werden können.

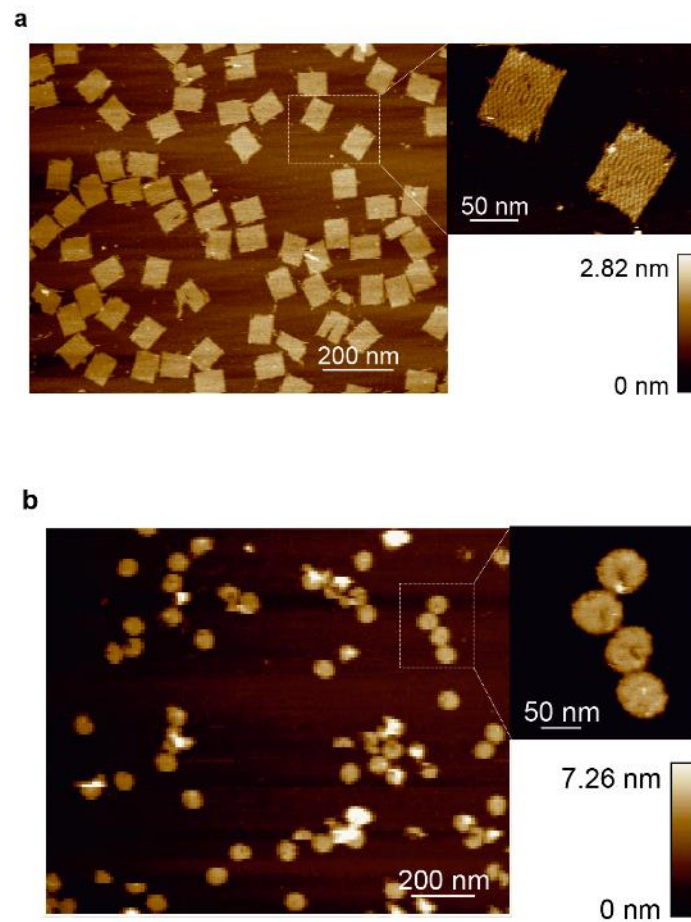


Abbildung 4-1: AFM Bilder der rechteckigen DNA-Origami-Struktur (a) und der DNA-Origami-Nanodisk (b). Die kleineren Bilder zeigen einen vergrößerten Ausschnitt der Strukturen mit der dazugehörigen Höhenskala. Wiedergabe aus Lit.[<sup>72</sup>] mit Genehmigung der American Chemical Society.



### 4.1.2 Beladung der ZMWs

Da die DNA-Origami-Nanodisk einen kleineren Durchmesser besitzt als die kleinste ZMW (80 nm Durchmesser) wurde das rechteckige DNA-Origami verwendet, um den Größenausschluss bei der Platzierung in der Apertur zu demonstrieren. Durch die Dimension des NROs kann dieses nicht in ZMWs mit einem Durchmesser von weniger als 120 nm anbinden. Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein DNA-Doppelstrang (dsDNA), welcher ebenfalls mit einem Biotin-Molekül und dem Fluoreszenzfarbstoff ATTO 647N modifiziert war, in die ZMWs gebunden (siehe Abb.4-2). Dies diente später als Referenz für den Vergleich der spektroskopischen Eigenschaften der Farbstoffe in den ZMWs (siehe Kapitel 4.1.3).

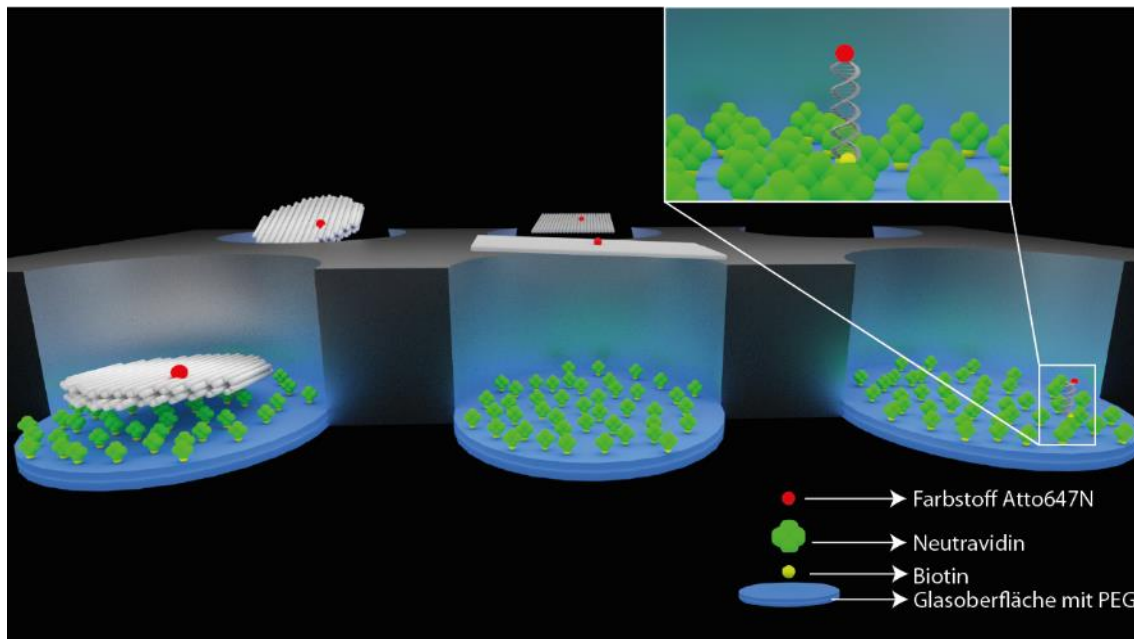


Abbildung 4-2: Übersicht über die ZMWs mit den verschiedenen DNA-Origami-Nanoadaptoren. Aufgrund der Größe können die Nanodisk und die dsDNA auch in die kleineren Aperturen anbinden. Das NRO hat eine Diagonale von ca. 122 nm und ist von dem anbinden in die kleineren Größen wie beispielsweise der 85 nm ZMWs ausgeschlossen, verändert nach<sup>72</sup>.

Im ersten Schritt wurde ein NRO mit vier Biotinen an den Ecken des DNA-Origami verwendet (siehe Abb. 4-3).

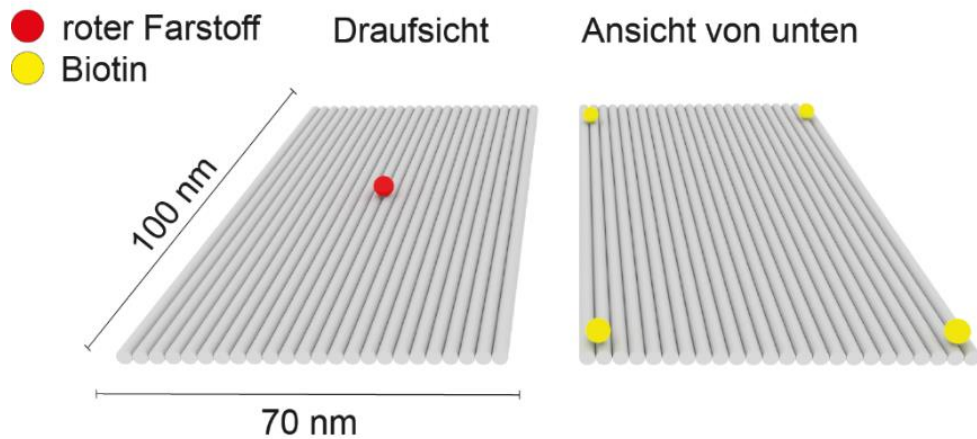


Abbildung 4-3: Abgebildet ist der modifizierte rechteckige Nanoadapter mit vier Biotinen, welche am Rand platziert sind. Die Position des Farbstoffes befindet sich mittig auf der Oberseite.

Um die Anzahl der DNA-Origami-Nanoadapter in den ZMWs zu bestimmen, wurden wie in Kapitel 3.2 beschrieben, fluoreszenzspektroskopische Messungen durchgeführt. Hierfür wurde im ersten Schritt ein Übersichtsscan durchgeführt (siehe Abb.4-4).

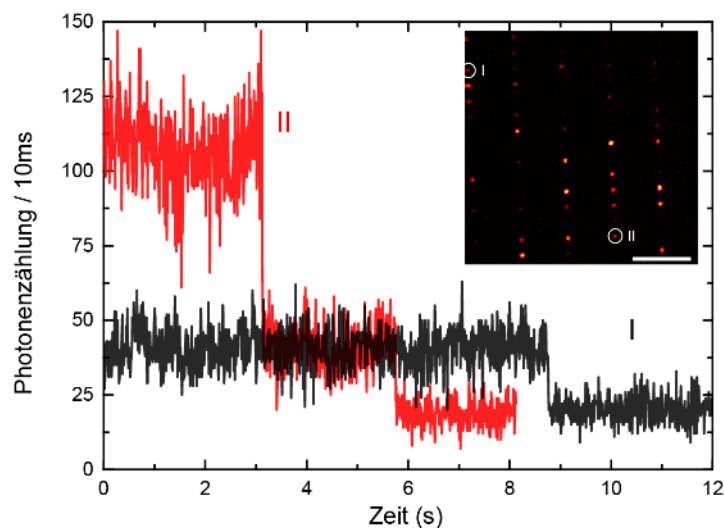


Abbildung 4-4: Dargestellt sind die typischen Intensitätspuren, welche nach dem Scan aufgenommen worden sind. Die jeweiligen Spots I und II wurden im Laserfokus platziert und die Spuren aufgenommen. Bei dem ersten Spot ist nur ein Bleichschritt zu erkennen, damit handelt es sich um ein einzelnes Molekül. Bei dem zweiten Spot sind zwei Bleichschritte zu erkennen. In diesem Fall handelt es sich um zwei Farbstoffmoleküle. Der Maßstabsbalken beträgt 5 µm. Wiedergabe aus Lit.<sup>[72]</sup> mit Genehmigung der American Chemical Society.

Nach jedem Scan wurden die belegten ZMWs in den Laserfokus platziert. Anhand der Anzahl der Bleichschritte der Intensitätspur konnte die Anzahl der Farbstoffmoleküle in den belegten ZMWs bestimmt werden.

Wurde kein Molekül detektiert, obwohl im Scan die ZMW belegt war, wurde dieser zu der Einzelbelegung hinzugezählt. Dies konnte erfolgen, da das gleichzeitige Bleichen von zwei Farbstoffmolekülen im Scan unwahrscheinlich ist.

Die Ergebnisse der Belegung sind in Abbildung 4-5 dargestellt.

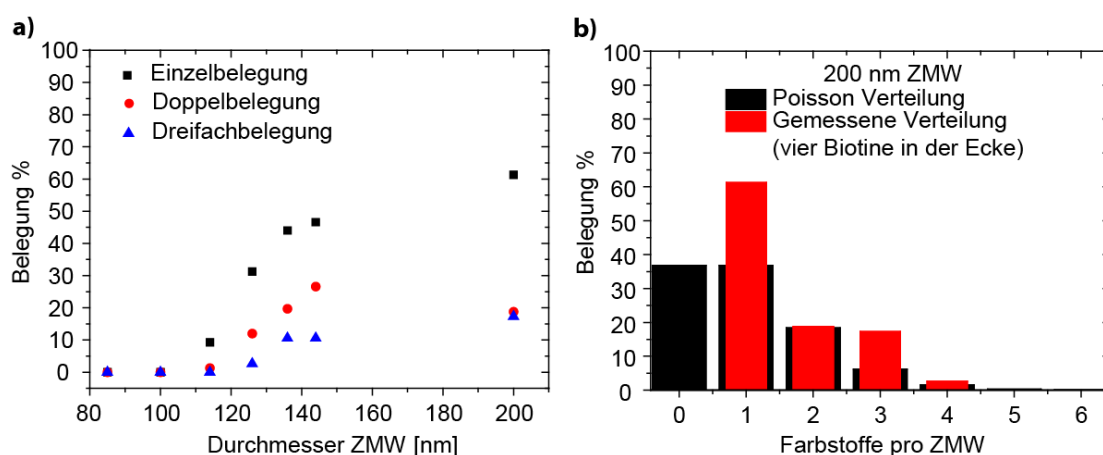


Abbildung 4-5: Dargestellt ist die Beladung für verschiedene Durchmesser der ZMW a) und der Vergleich der Poisson-Verteilung mit der gemessenen Verteilung des Nanoadapters mit den Biotinen in der Ecke b). Alle ZMW der Größe von 200 nm konnten belegt werden. Eine dritte Fraktion mit einer Dreifachbelegung sowie einer kleinen Fraktion mit einer Vierfachbeladung wurde gemessen.

Bei der Messung war keine Fraktion ohne Belegung vorhanden. Im Fall der Einzelbelegung konnte eine maximale Belegung bei 60 % erreicht werden. In den 200 nm ZMWs wurde ebenfalls eine Fraktion mit einer Dreifach – und Vierfachbelegung gemessen. Diese sind höher als die erwartete Poisson-Verteilung. Ein möglicher Grund dafür könnten die Anordnung der Biotine an dem DNA-Origami sein. Da sich die vier Biotine an den Ecken befinden, sind diese in der Lage auch hochkant in den ZMWs zu binden (siehe Abb. 4-6).

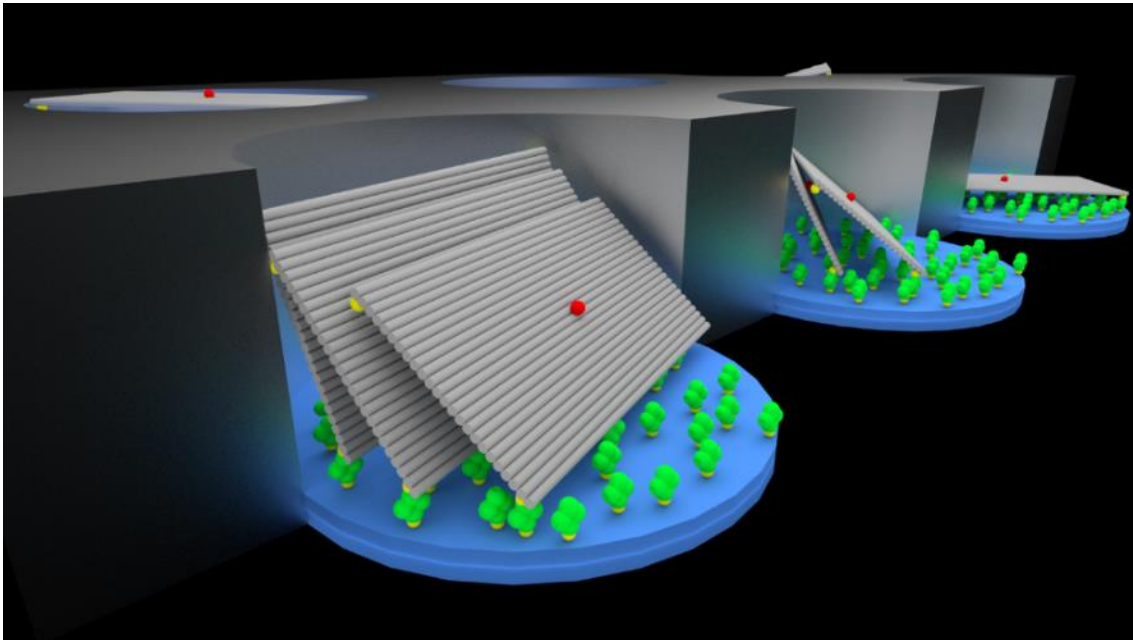


Abbildung 4-6: Die Biotine befinden sich am Rand des Nanoadapters. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, dass diese sich hochkant in den ZMWs anordnen können. Dadurch kann die Dreifach- und auch die Vierfachbelegung erklärt werden.

Die Position der Biotine spielt also eine wesentliche Rolle. Um zu gewährleisten, dass die DNA-Origami-Nanoadapter irreversibel und mittig in die ZMW binden, wurden statt vier nur zwei Biotine verwendet. Diese befinden sich nicht am Rand, sondern mittig an der Unterseite (siehe Kapitel 3.6). Durch diese Anordnung soll gewährleistet werden, dass die modifizierte Oberfläche vor einer weiteren Anbindung eines Nanoadapters geschützt ist.

Dies setzt voraus, dass die DNA-Origami-Strukturen parallel und so nah wie möglich an die modifizierte PEG-Glasoberfläche in der Apertur anbinden. Durch die Anordnung der Biotin-Moleküle im Zentrum der DNA-Origami-Nanoadapter ist nicht nur die Anbindung gewährleistet, sondern auch das Problem der Orientierung gelöst. Die DNA-Origami binden immer so in den Aperturen, dass sich der Farbstoff bzw. die biomolekulare Einheit immer auf der Oberseite befinden (siehe Abb. 4-7).

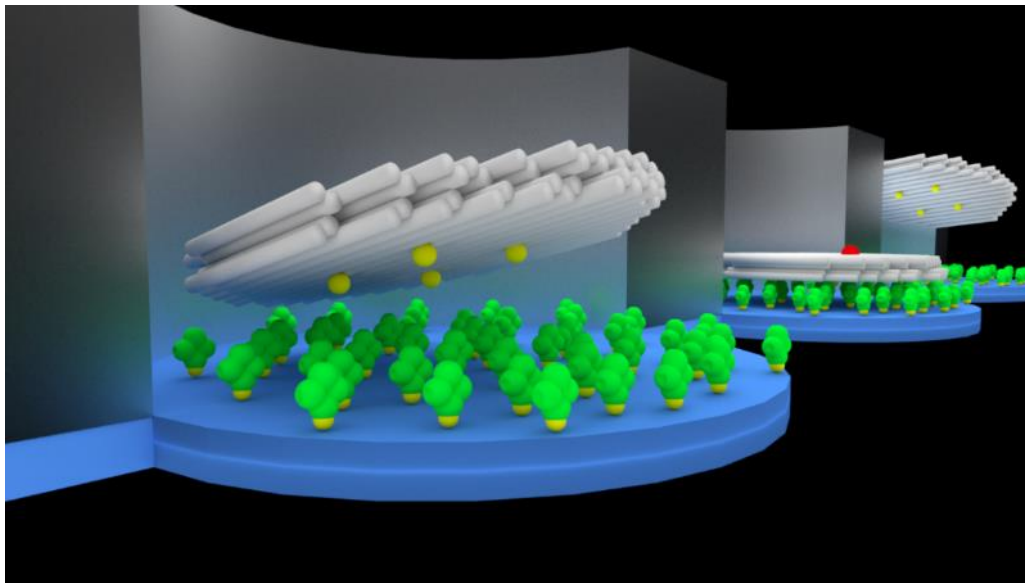


Abbildung 4-7: Abgebildet ist die Bindungsstrategie der DNA-Origami-Nanoadapter. Durch die mittige Anordnung der Biotine und der irreversiblen Bindung wird verhindert, dass sich mehr als ein Nanoadapter in den ZMWs bindet. Die Nanoadapter können somit als Transporter für Biomolekulare Proben verwendet werden. Verändert nach <sup>72</sup>.

Die Ergebnisse der Nanoadapter mit den zwei mittig angeordneten Biotinen sind in Abbildung 4-8 zusammengefasst.

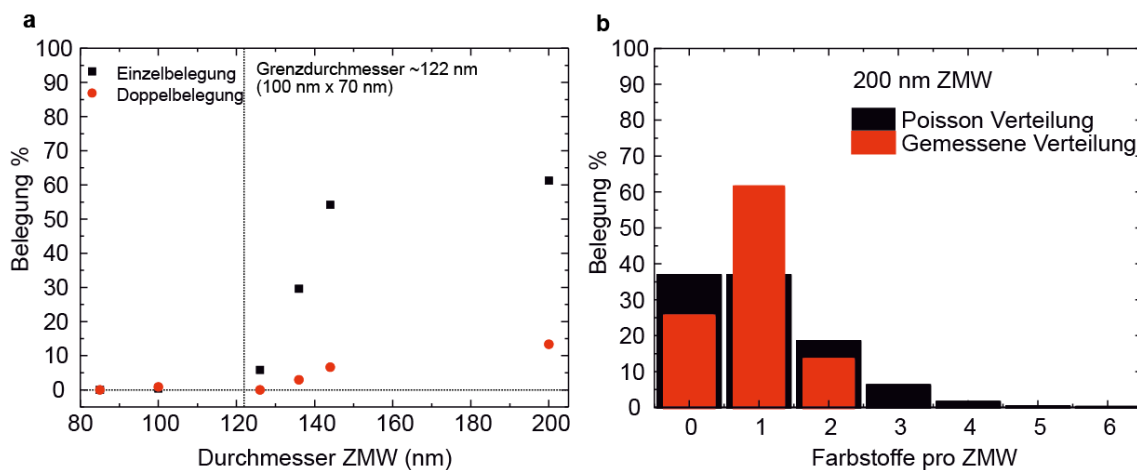


Abbildung 4-8: a) Aufgetragen ist die Belegung des rechteckigen Nanoadapters. Die Einzelbelegung bei den 200 nm ZMW beträgt über 60 %. Für kleinere Durchmesser sinkt die Belegung und aufgrund des Grenzdurchmessers von 122 nm des Nanoadapters ist keine Belegung bei den 100 nm und 85 nm ZMW vorhanden. b) Gegenübergestellt ist die Poisson-Verteilung mit der gemessenen Verteilung des rechteckigen Nanoadapters in den 200 nm ZMW. Für die Einzelbelegung ergibt sich ein Wert von über 60 %. Eine Fraktion mit einer Doppelbelegung ist zwar vorhanden, aber geringer als die ideale Poisson-Verteilung. Wiedergabe aus Lit.[<sup>72</sup>] mit Genehmigung der American Chemical Society.

Bei Durchmessern von weniger als 120 nm konnten aufgrund ihrer Größe keine Nanoadapter anbinden. Für Durchmesser größer als 120 nm steigt die Belegung stark an. Eine maximale Beladung von 60 % wird bei den 200 nm ZMWs erreicht. Ab einem Durchmesser von 140 nm wurde zudem eine Doppelbelegung der NRO Adapter beobachtet. Der Anteil der Doppelbelegungen ist jedoch erheblich geringer als gemäß einer Poisson-Verteilung (für  $\lambda = 1$ ) zu erwarten gewesen wäre. In diesem Falle treten keine Dreifach- oder Vierfachbelegungen auf.

Der Anteil der Einzelbelegungen, welcher durch eine stochastische Anbindung nur 20 – 35 % erreichen würde<sup>21,41</sup>, kann durch den Einsatz der Nanoadapter somit um das Doppelte gesteigert werden<sup>72</sup>.

Trotz längerer Einwirkzeit (1-2 Stunden), konnte keine vollständige Belegung erreicht werden. Die zwei Biotin-Moleküle an dem NRO können nur an einen kleinen Teil der modifizierten Oberflächen anbinden, sodass ein Fehlen von Neutravidin in diesem Bereich nicht zur Bindung geführt hat. Diese Begründung kann dadurch untermauert werden, dass die Belegung mit der dsDNA und der Nanodisk (siehe Abb.4-9) zu 100 % erfolgt.

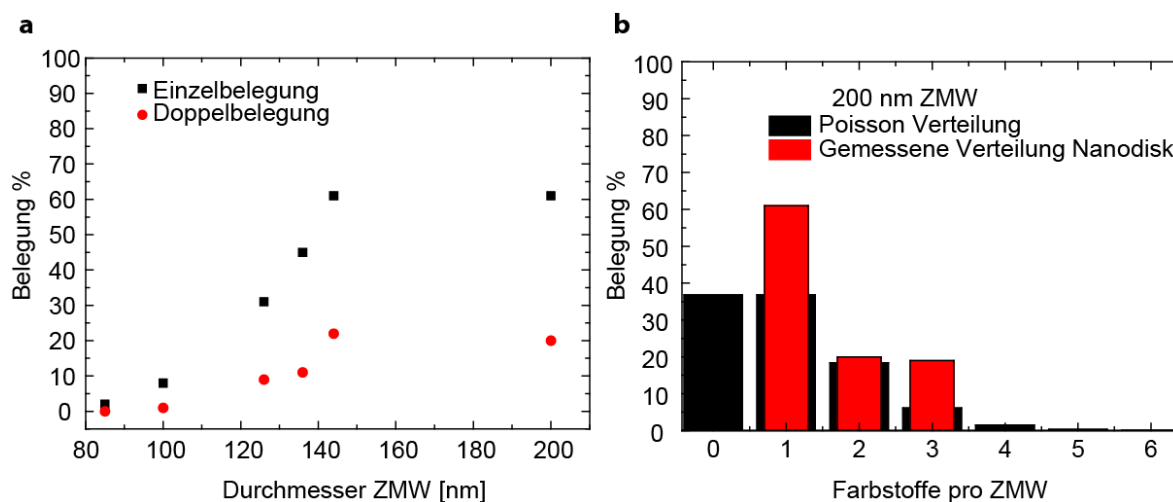


Abbildung 4-9: a) die Einzel- und Doppelbelegung für verschiedene ZMW Durchmesser der DNA-Origami-Nanodisk. Die Einzelbelegung erreicht wie bei den rechteckigen Nanoadaptern eine Sättigung bei über 60 %. b) Der Vergleich zwischen der Poisson-Verteilung und der gemessenen Verteilung der Nanodisk in den 200 nm ZMW. Aufgrund der Größe der DNA-Origami-Nanodisk kann diese mehr Bereiche abdecken, sodass im Gegensatz zu dem rechteckigen Nanoadapter keine Fraktion mit 0 Molekülen gemessen wurde. Unterschied zum NRO ist eine dritte Fraktion mit einer Dreifachbelegung, deren Anteil höher liegt als nach der Poisson-Verteilung erwartet. Wiedergabe aus Lit.<sup>[72]</sup> mit Genehmigung der American Chemical Society.

Bei der Nanodisk erfolgt auch hier bei den 200 nm ZMW eine Sättigung bei über 60 % für die Einzelbelegung. Aufgrund der Größe der Nanodisk und dass sich vier Biotin-Moleküle statt zwei auf der Unterseite befinden, wurde auch eine Fraktion mit einer Dreifachbelegung gemessen.

Zur Kontrolle wurden die Experimente wiederholt, mit dem Unterschied, dass die DNA-Origami-Nanoadapter nicht mit Biotin funktionalisiert waren. Dies soll zeigen, dass die Bindung ausschließlich über die Biotin-Neutravidin-Bindung stattfand (Abb.4-7). In diesem Fall wurde kein Molekül detektiert (kein Molekül in 225 ZMWs für jeden Durchmesser).

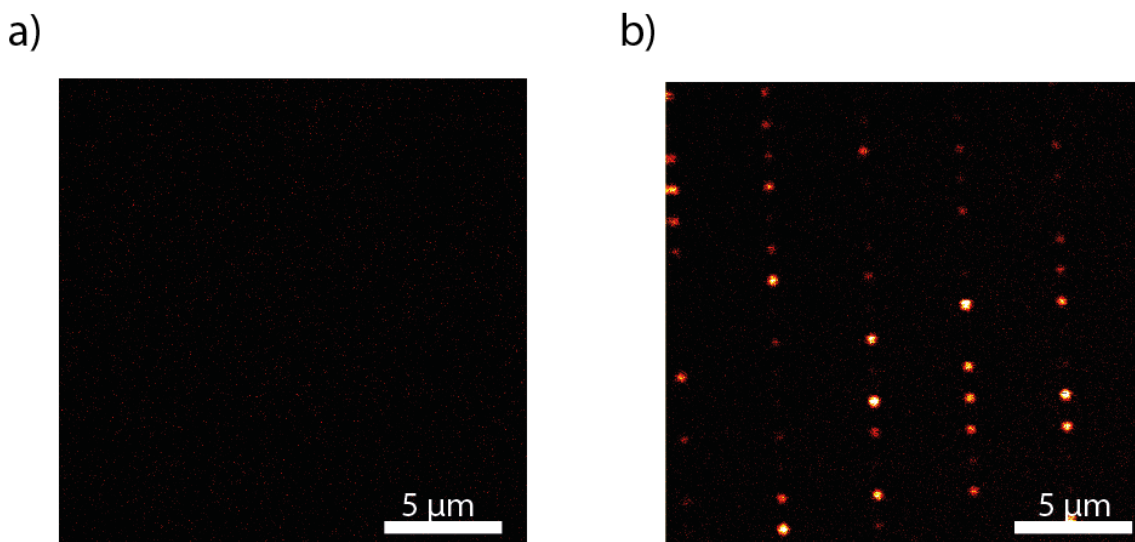


Abbildung 4-10: Abgebildet sind die fluoreszenzspektroskopischen Aufnahmen der NRO Nanoadapter a) ohne Biotine und mit den b) mittig angeordneten Biotinen in den 200 nm ZMW. Ohne Biotine erfolgte keine Anbindung in den 200 nm ZMW.

Zusammengefasst befinden sich alle Daten der Belegung für die 200 nm ZMWs in Tabelle 4-1.

Tabelle 4-1: Alle Daten der Belegung in den 200 nm ZMW. In der letzten Zeile befinden sich die Werte einer idealen Poisson-Verteilung zum Vergleich.

Anzahl Farbstoffe	0	1	2	3	4
NRO 2 Biotine im Zentrum	25,42 %	61,25 %	13,33 %	-	-
Nanodisk	-	61,00 %	20,00 %	19 %	-
NRO Biotine in der Ecke	-	61,30 %	18,80 %	17,30 %	2,60 %
Poisson-Verteilung	36,78 %	36,78 %	18,39 %	6,13 %	1,52 %



#### 4.1.3 Fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften in den ZMWs

Um die Eigenschaften der Fluoreszenz der Farbstoffe in den ZMWs näher zu untersuchen, wurde die Nanodisk und die dsDNA verwendet. Zum Vergleich wurde die Fluoreszenzlebensdauer in den 200 nm und 100 nm ZMWs gemessen und verglichen (Abb.4-11).

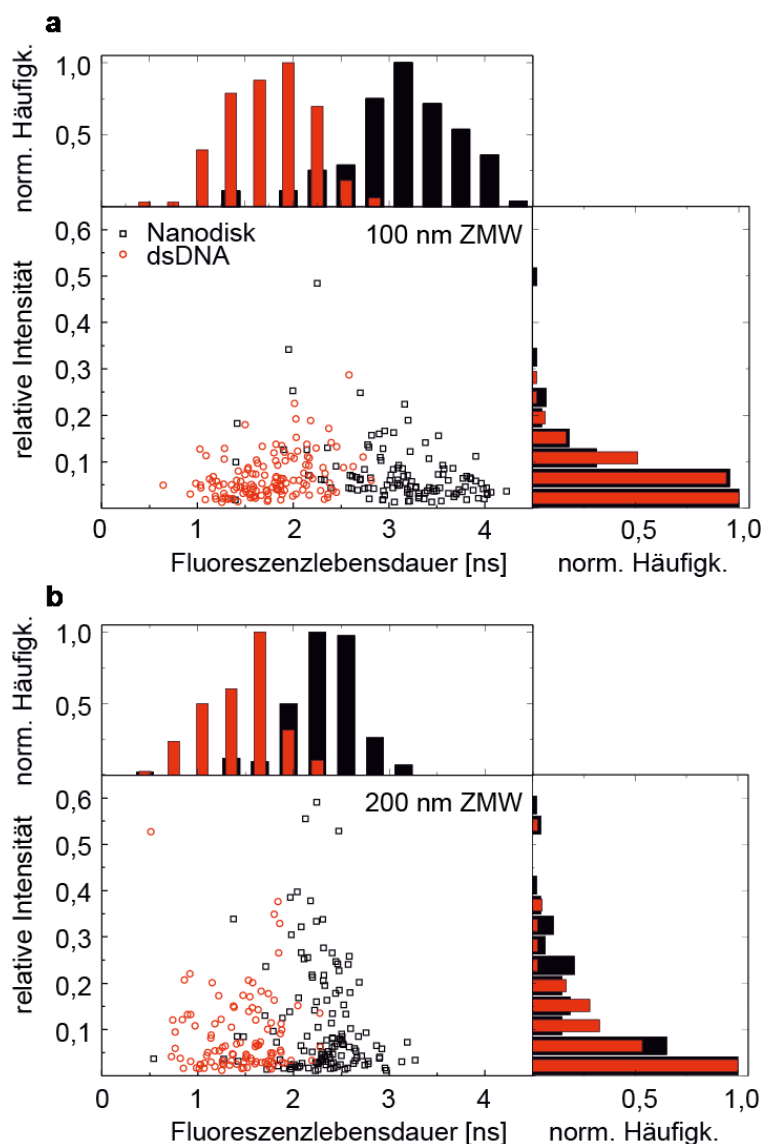


Abbildung 4-11: Die Fluoreszenzlebensdauern für die Nanodisk und die dsDNA in den a) 100 nm ZMW und b) 200 nm ZMW. Die Intensitäten in sind in beiden Fällen geringer als bei der Messung außerhalb der ZMW. Es gibt eine kleine Überschneidung der Population der dsDNA und der Nanodisk. Die Fluoreszenzlebensdauern der Nanodisk sind in den 100 nm ZMW höher als in den 200 nm ZMWs. Wiedergabe aus Lit.<sup>[72]</sup> mit Genehmigung der American Chemical Society.



Für die Referenz wurden die Fluoreszenzlebensdauern der dsDNA und Nanodisk in einem LabTek gemessen (siehe Material und Methoden). Die Messung zeigt, dass es keine Unterschiede bei den Fluoreszenzlebensdauern gibt (siehe Abb.4-12).

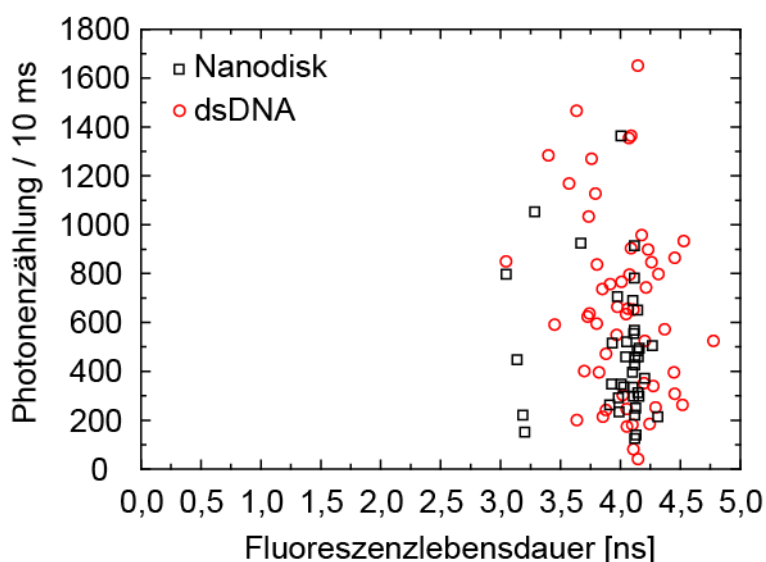


Abbildung 4-12: Die Referenzmessung der Nanodisk und der dsDNA in einem LabTek. Es ergeben sich keine Unterschiede in der Fluoreszenzlebensdauer. Wiedergabe aus Lit.[72] mit Genehmigung der American Chemical Society.

Für die dsDNA in der 200 nm und 100 nm ZMW wurde eine Fluoreszenzlebensdauer von  $1,5 \pm 0,4$  ns gemessen. Für die Nanodisk betrug die Fluoreszenzlebensdauer in der 200 nm ZMW  $2,4 \pm 0,3$  ns und für die 100 nm ZMW  $3,2 \pm 0,5$  ns. Die Verteilungsbreite der Fluoreszenzlebensdauer ist normalerweise bei einer längeren Abklingdauer größer<sup>75</sup>, in diesem Fall zeigen die Fluoreszenzlebensdauern bei beiden Fällen eine homogene Verteilung (siehe Abb.4-12). Eine Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer ist in beiden ZMWs und bei den unterschiedlichen Strukturen erkennbar. Dieses steht im Einklang mit anderen Ergebnissen in der Literatur<sup>21,76–78</sup>. Die Fluoreszenzlebensdauer in den 100 nm ZMW ist für den Fall der Nanodisk höher als in den 200 nm ZMW. Dies ist ungewöhnlich, da normalerweise bei einem kleineren Durchmesser der Einfluss der Metallwände

auf die verschiedenen Raten zunimmt. Um die Ergebnisse besser interpretieren zu können, wurden elektromagnetische FDTD<sup>10</sup>-Simulationen durchgeführt<sup>72</sup>. Diese zeigen die Verteilungen der Fluoreszenzlebensdauern für die auf einer Glasoberfläche bzw. in der ZMW immobilisierte Probe (siehe Abb.4-13).

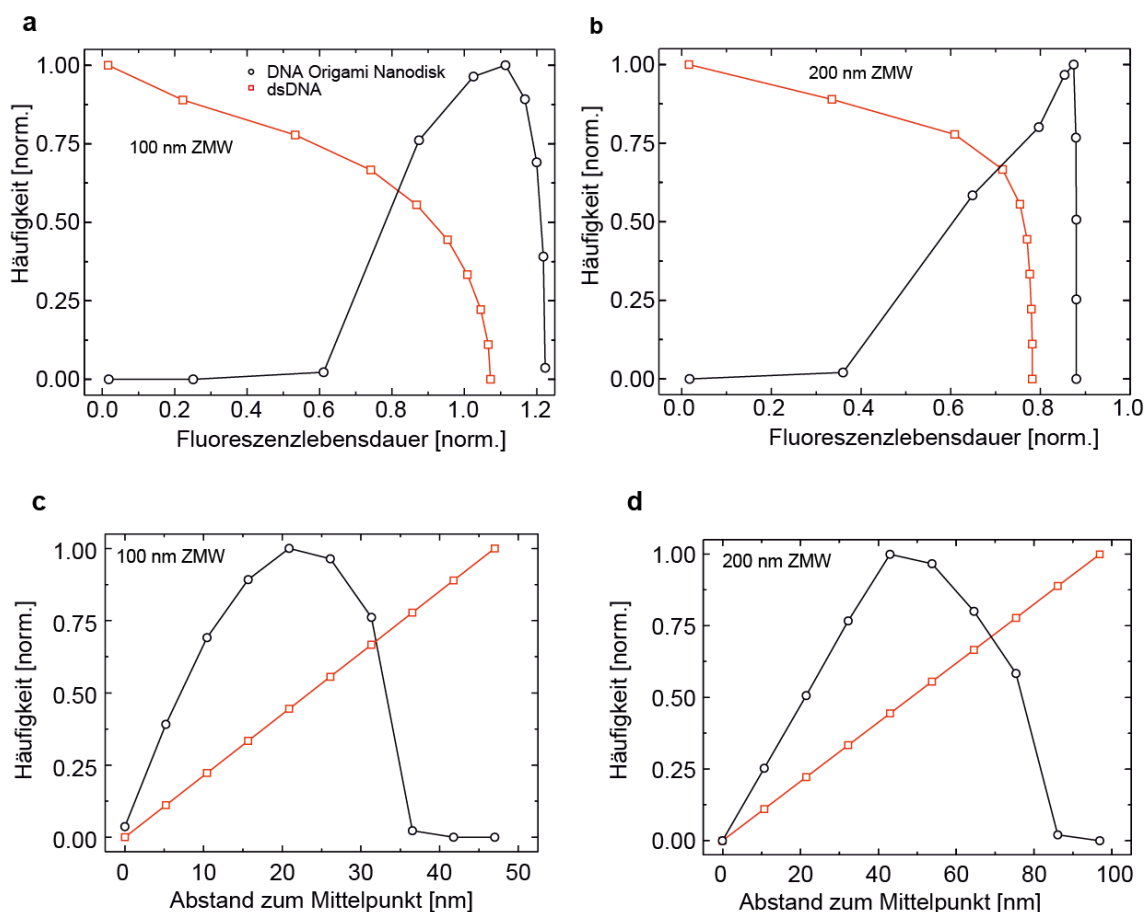


Abbildung 4-13: Aufgetragen sind die simulierten Fluoreszenzlebensdauern der dsDNA und der Nanodisk in den a) 100 nm ZMW und b) den 200 nm ZMW. Die Fluoreszenzlebensdauern sind auf die in der Referenz gemessenen Werte normiert. c) und d) zeigen die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der beiden Strukturen in der ZMW. Die Position bezieht sich auf den Abstand vom Mittelpunkt der ZMW. Zur Verfügung gestellt von Dr. Guillermo Acuna. Wiedergabe aus Lit.[72] mit Genehmigung der American Chemical Society.

Die Simulationen bestätigen die experimentellen Ergebnisse und erklären zum Teil die höheren Fluoreszenzlebensdauern in kleineren ZMW. Zur zusätzlichen Bestätigung der Ergebnisse wurden die Fluoreszenzlebensdauer der NRO Nanoadapter bestimmt und

<sup>10</sup> Finite Difference Time Domain: Finite-Differenzen-Methode im Zeitbereich. Es handelt sich hierbei um klassische numerische Verfahren zur Lösung von Differenzialgleichungen (<sup>46</sup>).

mit den obigen Daten verglichen. Auch hier ist der Trend zu längeren Fluoreszenzlebensdauern bei kleineren Durchmessern zu erkennen (siehe Abb. 4-14).

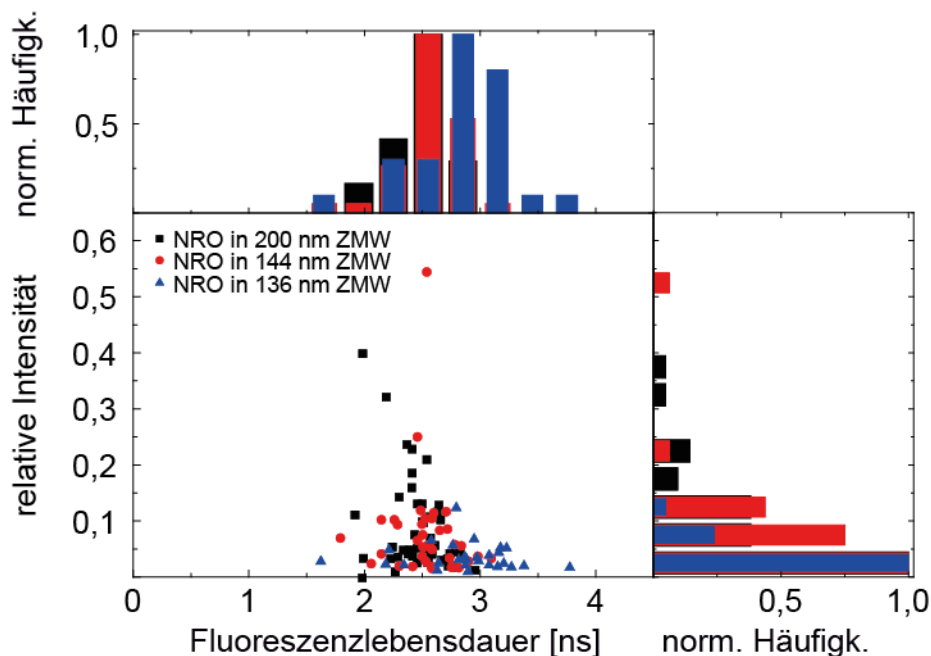


Abbildung 4-14: Aufgetragen sind die Fluoreszenzlebensdauern des NRO in verschiedenen ZMW Durchmessern. Die Fluoreszenzlebensdauern werden für kleinere Durchmesser höher. Die Intensität ist in der ZMW um den Faktor  $\sim 10$  geringer als außerhalb der ZMW.

Die Verteilung der Fluoreszenzlebensdauern ist ähnlich wie bei der Nanodisk. Es wurden keine Fluoreszenzlebensdauern unter 1.5 ns gemessen. Grund hierfür ist der höhere Mindestabstand von den Metallwänden von  $\sim 35$  nm.

Um die Fotophysikalischen Prozesse in den ZMWs besser zu verstehen, wurde die Nanodisk so modifiziert, dass sich der Farbstoff am Rand des Origami befindet (siehe Abb. 4-15). Durch diese Anordnung kann jede mögliche Position des Farbstoffes in den ZMWs ermöglicht werden. Die nachfolgenden Messungen und Auswertungen wurden von Phil Holzmeister durchgeführt<sup>76</sup>.

Für die Messungen wurde der Sauerstoff enzymatisch entzogen um Triplett Blinken zu induzieren, welches zu einer monoexponentiellen Abklingkurve der Autokorrelationsfunktion führt. Das hellste Molekül (orange) hat eine kürzere Fluoreszenzlebensdauer (Abb. 6e) als ein Molekül mit mittlerer- (Magenta) oder niedriger Intensität (olivgrün).

Alle hier gemessenen Moleküle sind von der Intensität niedriger als die Referenzmessung (die Diskussion der Fluoreszenzintensität in den ZMW erfolgt im Kapitel 4.1.4)<sup>76</sup>.

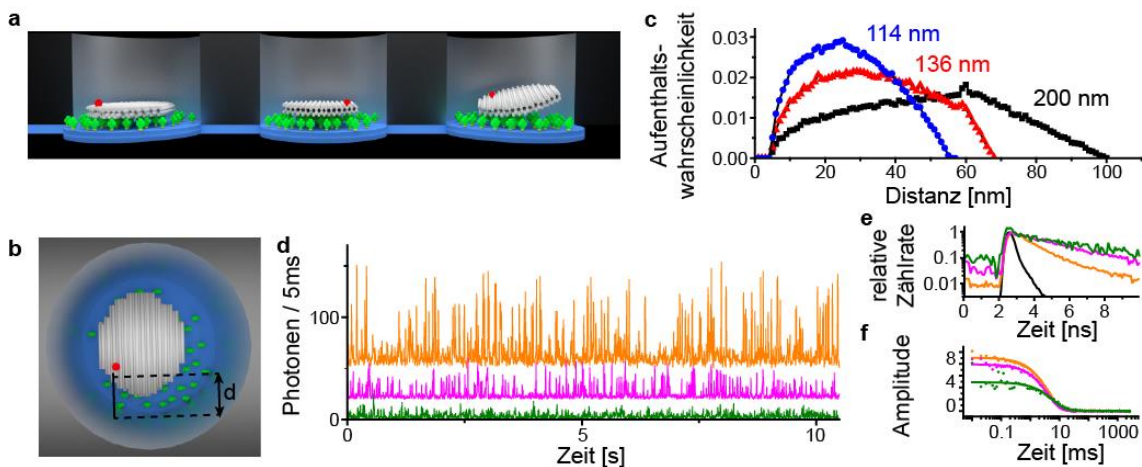


Abbildung 4-15: Übersicht der Messungen und der Nanodisk in den ZMWs. a) Abgebildet ist die Nanodisk in den ZMWs. Der Farbstoff ATTO 647N (roter Punkt) befindet sich am Rand der Nanodisk. b) Draufsicht auf die ZMW in dem die Nanodisk immobilisiert ist. Der Farbstoff besitzt durch die Anordnung auf der Nanodisk immer einen Mindestabstand zu der Metallwand der ZMW und zusätzlich die Möglichkeit jede beliebige mögliche Position in der ZMW anzunehmen. c) Abstandssimulationen bezüglich des Farbstoffes von den Aluminiumwänden der ZMW, für die Durchmesser 200 nm (schwarz), 136 nm (rot) und 114 nm (blau). Die Simulationen wurden für 100.000 Nanodisk berechnet. d) Fluoreszenzintensitätspuren für drei unterschiedliche Farbstoffmoleküle in den 114 nm ZMWs. Die Heterogenität kommt die unterschiedlichen Positionen der Farbstoffe in den ZMWs zustande. Zur Besserung Darstellung wurden unterschiedliche Versätze verwendet. e) die zu den Fluoreszenzintensitätspuren korrespondierenden Fluoreszenzabklingkurven. Die schwarze Kurve stellt zum Vergleich die IRF dar und f) die korrespondierenden AC Funktionen. Zur Verfügung gestellt von Dr. Phil Holzmeister. Wiedergabe aus Lit.[<sup>76</sup>] mit Genehmigung der Nature Publishing Group.

Anhand der oben gezeigten Messungen, konnten Rückschlüsse auf die verschiedenen Raten, der Anregungsrate und der Quantenausbeute geschlossen werden (Abb. 4-16)<sup>76</sup>. Die Reduzierung der Anregungsrate kann teilweise durch das evanescentes Anregungsfeld der ZMW erklärt werden. Interessanterweise steigt die Fluoreszenzlebensdauer bei kleineren Durchmessern der ZMW. Dies erscheint auf den ersten Blick nicht intuitiv. Befindet sich ein Fluorophor näher an den Metallwänden sollte sich die Fluoreszenzlebensdauer reduzieren. Grund hierfür ist, dass die radiativen Raten in kleinen ZMWs unterdrückt werden. Je schlechter das Anregungsfeld in die Apertur ist, desto schlechter kann es raus. Um einen systematischen Fehler auszuschließen, wurden die Ergebnisse durch die Arbeitsgruppe Wenger bestätigt (siehe Anhang). Es wurden die gleichen ZMW verwendet und der Trend zu längeren Fluoreszenzlebensdauern konnte bestätigt werden.

Der Grund für den Einfluss auf die nicht-radiative Rate kann zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden.

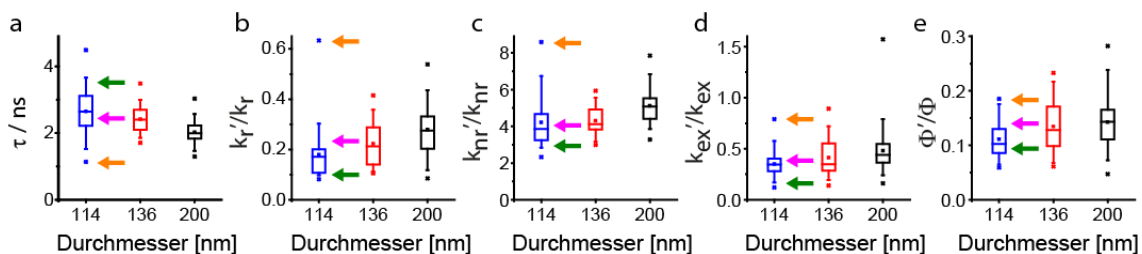


Abbildung 4-16: Dargestellt sind die Fotophysikalischen Eigenschaften von einzelnen Farbstoffmolekülen in verschiedenen ZMW Durchmessern. a) Verteilung der Fluoreszenzlebensdauer in verschiedenen ZMWs mit den Durchmesser 114 (n= 45), 136 (n=45) und 200 nm (n=90). Die Punkte repräsentieren den Maximal-, Mittel- und Minimalwert. Die Whisker und Boxen beinhalten 95-5 % und 75-25 %. Die horizontale Linie gibt den Medianwert der Verteilung an. Die drei Pfeile (Orange, Grün und Magenta) repräsentieren die Moleküle aus Abbildung 4-15. (b-c) Verteilung der radiativen und der nichtradiativen Rate. Für kleine Durchmesser ist ein Trend zu niedrigen Fotophysikalischen Raten erkennbar. Durch diesen Trend steigt die Fluoreszenzlebensdauer bei niedrigen Durchmessern. Zur Verfügung gestellt von Dr. Phil Holzmeister. Wiedergabe aus Lit.[<sup>76</sup>] mit Genehmigung der Nature Publishing Group.

### 4.1.4 Eigenschaften der Fluoreszenzintensität der Farbstoffe in den ZMW

Die Intensität in den ZMW war bei jeder Messung um den Faktor 10 geringer als außerhalb der ZMW. Bei den Messungen konnte nicht ein Molekül detektiert werden, welches eine Intensitätssteigerung aufwies. Dies wurde in einer anderen Messung mit den gleichen ZMWs bestätigt <sup>76</sup>. Dies ist zunächst überraschend, da in zahlreichen Veröffentlichungen von einer Intensitätserhöhung gesprochen wird <sup>77,79–83</sup>. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Simulationen und FCS - Messungen. Um die in dieser Arbeit gemessenen Daten mit denen in der Literatur zu vergleichen, müssen einige Aspekte berücksichtigt werden:

- Das Material: Die hier verwendeten Farbstoffe zeigen eine starke Resonanzwechselwirkung mit Gold und Silber. Die spektralen Resonanzen für Aluminium befinden sich im UV-Bereich <sup>84,85</sup>. Die Simulationen für Aluminium sagen zwar eine geringe Intensitätssteigerung voraus, der Hauptteil der Simulationen basiert aber auf der Verwendung von Gold und Silber. Neuere Messungen zeigen hingegen keine Intensitätsverbesserungen bzw. die gleichen Ergebnisse in den gleichen ZMW, welche in dieser Arbeit verwendet wurden <sup>76 86</sup>.
- In dieser Arbeit wurden einzelne ZMW untersucht. Die Wellenlängen für Intensitätsverbesserungen hängen dabei von Faktoren wie der Anzahl der ZMW <sup>87</sup>, der Größe der ZMW <sup>88</sup> sowie der Anordnung der ZMWs <sup>89</sup> ab. Die Intensitätssteigerung tritt nur ein, wenn die Anregungswellenlänge auf die Resonanz trifft, welche durch die oben beschriebenen Parameter eintritt. Ist die Anregungswellenlänge nicht in Resonanz mit der Apertur, kann keine Intensitätssteigerung erfolgen.
- Bei den Simulationen der Anregungsfelder in isolierten ZMWs wird eine ebene, polarisierte Welle in der Ebene der Grenzfläche der ZMW verwendet <sup>85,90</sup>. Dies ist eine starke Vereinfachung. Wird Licht auf eine Apertur in verschiedenen Winkeln fokussiert führt dies zu unterschiedlichen Werten und der Diskrepanz zwischen Simulation und Experiment.

Ein Grund für die niedrige Intensität ist wahrscheinlich die Passivierungs-Schicht die ein Areal blockiert, in dem eine Intensitätssteigerung möglich wäre. Bezüglich der Fluoreszenzintensität wurden ebenfalls Kontrollmessungen der Arbeitsgruppe Wenger durchgeführt. Die Messungen bestätigen die hier gezeigten Daten. Ein

Grund könnte die Passivierungsschicht sein, die ein Areal blockt, in welcher eine Intensitätssteigerung stattfinden könnte.

Die hier in dieser Arbeit gemessenen Intensitäten stehen nicht im Widerspruch zur Literatur, sondern zeigen nur weitere spektroskopische Eigenschaften der Farbstoffe in den ZMWs.

#### 4.2 Eigenschaften des FRET-Wertes im Hotspot einer DNA-Origami Nanoantenne

Für die Untersuchung des FRET-Wertes wurden zwei Varianten der Nanoantenne verwendet (siehe Material und Methoden). Die theoretisch erwartete Energietransfereffizienz kann nach Gleichung 2.5 berechnet werden. Dazu wird das Überlappungsintegral  $J$  aus dem Emissionsspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors berechnet. Der Försterradius wird nach Gleichung 2.6 berechnet. Für den Brechungsindex wird der Wert von Wasser verwendet  $(1,33)^{38}$ . Die Werte der Donorquantenausbeute  $\phi_D$  wurden aus der Literatur entnommen<sup>91,92</sup>. Die Farbstoffe sind über einen Linker an das Nukleotid gebunden. Dadurch ergibt sich keine spezifizierte Orientierung und der Wert für  $\kappa^2$  wird auf 2/3 gesetzt (siehe Kapitel 2.2). Die berechneten Werte für die beiden n Anordnungen der Farbstoffe sind in Tabelle 4-2 angegeben.

Tabelle 4-2: Aufgelistet sind sämtliche Werte, die zur Berechnung der Energietransfereffizienz benötigt werden.

FRET-Paar	$\kappa^2$	$J[\text{L/mol} \cdot \text{cm} \cdot \text{nm}^4]$	$\phi_D$	$R_0$ [nm]	$r$ [nm]	$E_{\text{theoretisch}}$
Cy3B / ATTO 647N	2/3	5,99	0,67	6,49	7,14	0,36
ATTO 532 / ATTO647N	2/3	3,02	0,9	6,09	3,4	0,97

Für das FRET Paar Cy3B/ATTO 647N beträgt die FRET-Effizienz 0,36 und für das FRET Paar ATTO 532/ATTO 647N 0,97. Im nachfolgenden wird die Nanoantenne mit dem FRET-Paar Cy3B/ATTO 647N als nF (niedrige FRET Probe) und die Nanoantenne mit dem ATTO 532/ATTO 647N Paar als hF (hohe FRET Probe) bezeichnet.

Die Herstellung, Reinigung und das Anbinden der Goldnanopartikel an die Nanoantennen erfolgt wie im Kapitel 3 beschrieben. Die genauen Zusammensetzungen und Konzentrationen befinden sich im Anhang. Die korrekte Faltung der DNA-Origami Nanoantenne wird mittels der Rasterkraftmikroskopie überprüft. Abbildung 4-17 zeigt eine solche Aufnahme der Nanoantenne. Das Übersichtsbild zeigt, dass alle Strukturen korrekt gefaltet haben und eine hohe Anzahl von Nanoantennen vorhanden ist. Die Basis hat eine hammerähnliche Struktur und passt mit dem theoretischen Design überein.



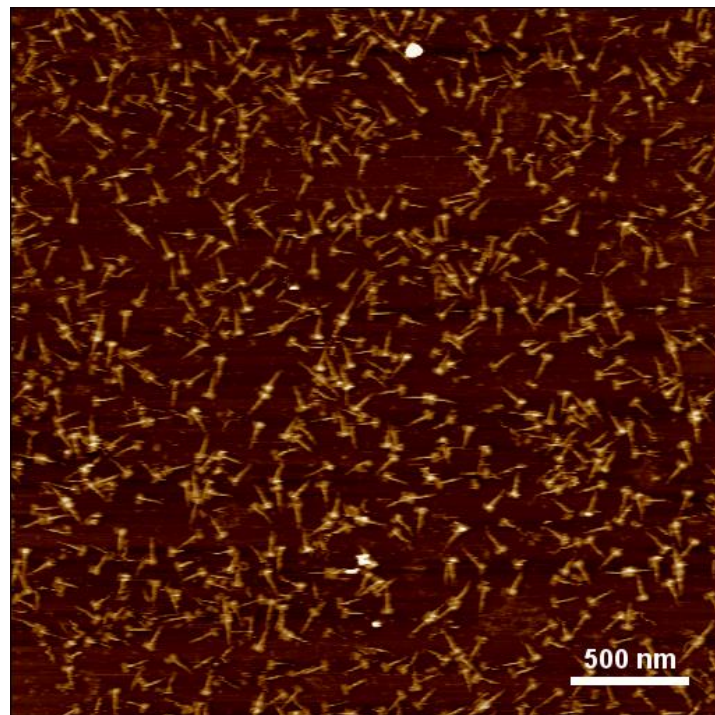


Abbildung 4-17: Dargestellt ist eine AFM Aufnahme der Nanoantenne. Das Übersichtsbild zeigt, dass die Nanoantenne korrekt gefaltet hat und in hoher Anzahl vorhanden ist

Im ersten Schritt wurde die FRET-Effizienz der beiden Proben im präparierten LabTek gemessen (siehe Material und Methoden), um einen Vergleich mit den theoretischen Werten zu erhalten. Hierzu wurden, analog wie bei den Nanoadaptoren, Fluoreszenzintensitätsspuren aufgenommen. Abbildung 4-18 zeigt solch eine Spur.

Die Anregung der Laser erfolgt alternierend (100 ms). Die rote Spur repräsentiert die Akzeptorabsorption-Akzeptoremission ( $Fl_A^A$ ), die orange Spur die Donorabsorption-Akzeptoremission ( $Fl_D^A$ ) und die grüne Spur die Donorabsorption-Donoremission ( $Fl_D^D$ ). Anhand dieser Spuren erfolgt nach Gleichung 2-11 die Bestimmung der FRET-Effizienz. Abbildung 4-19 zeigt die Werte für die beiden Varianten der Nanoantenne.

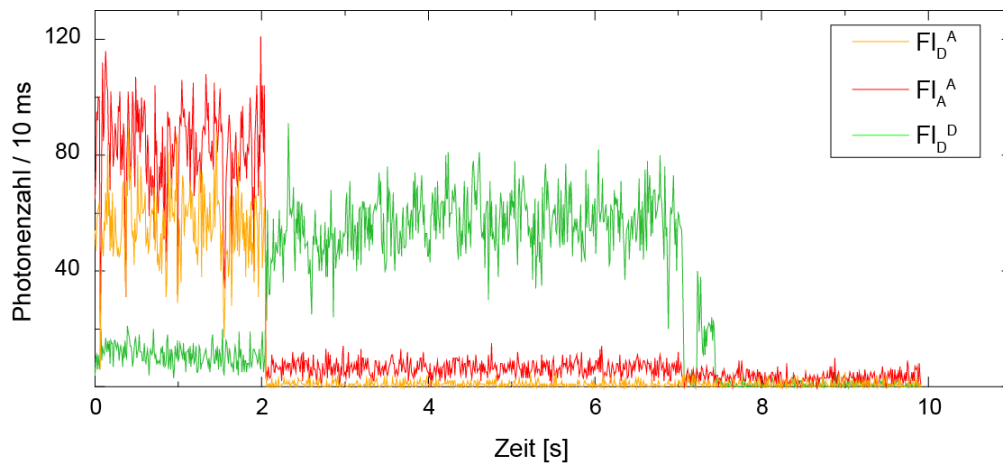


Abbildung 4-18: Dargestellt ist eine typische Intensitätsspur. Die Anregungsleistung beträgt  $3\text{ }\mu\text{W}$  beim roten und  $2\text{ }\mu\text{W}$  beim grünen Laser. Die Zeit pro Bin beträgt  $10\text{ ms}$ . Die Alternierungsfrequenz der beiden Laser beträgt  $10\text{ Hz}$ . Die rote Spur ( $F_A^A$ ) repräsentiert die Emission des ATTO 647N bei direkter Anregung. Die grüne Spur ( $F_D^D$ ) repräsentiert die Emission des ATTO 532 bei direkter Anregung. Die orange Spur ( $F_D^A$ ) repräsentiert die Emission des ATTO 647N bei Anregung des ATTO 532 (FRET-Kanal). Die Intensität des Donorfarbstoffes erhöht sich, wenn der Akzeptor irreversibel zerstört wird, da dieser die Energie nicht mehr aufnehmen kann.

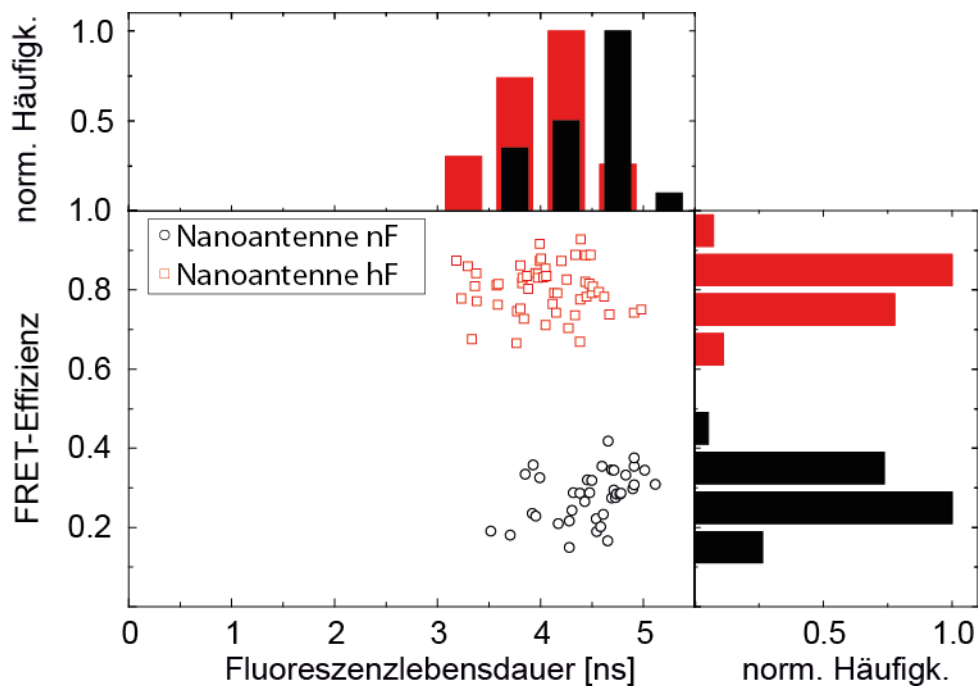


Abbildung 4-19: Aufgetragen ist die Fluoreszenzlebensdauer gegen die FRET-Effizienz. Die Werte für die Fluoreszenzlebensdauern unterscheiden sich nur gering. Die Messung bestätigt die theoretische Berechnung der FRET-Werte. Es gibt eine Variante mit einem hohen und einem niedrigem FRET-Wert. In Zusammenarbeit mit Johann Bohlen<sup>93</sup>.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden histogrammiert und mittels einer Gauß Funktion gefittet, um den Fehler der Fluoreszenzlebensdauer zu bestimmen. Die Fluoreszenzlebensdauer der nF Nanoantenne beträgt  $4,48 \pm 0,04$  ns und die der hF Nanoantenne  $4,05 \pm 0,02$  ns. Die erhaltenen Werte der Fluoreszenzlebensdauern werden dann als Referenz für die Messungen mit den Goldnanopartikeln verwendet. Für die hF Nanoantenne beträgt der  $E$ -Wert  $0,81 \pm 0,04$  und für die nF Nanoantenne  $0,30 \pm 0,08$ . Alle gemessenen Daten sowie die theoretischen Werte sind in den Tabellen 4-3 und 4-4 zusammengefasst:

Tabelle 4-3: Zusammenfassung der theoretischen und den gemessenen Fluoreszenzlebensdauern der beiden Nanoantennen.

Nanoantenne	Fluoreszenzlebenszeit experimentell [ns]
hF	$4,08 \pm 0,06$
nF	$4,57 \pm 0,04$

Tabelle 4-4: Zusammenfassung der theoretischen und den gemessenen FRET-Werten der beiden Nanoantennen.

Nanoantenne	FRET-Effizienz experimentell	FRET-Effizienz theoretisch	Abweichung [%]
hF	$0,81 \pm 0,04$	0,97	15,90
nF	$0,30 \pm 0,08$	0,36	0,00 (innerhalb der Fehlergrenze)

Im nächsten Experiment wurde die FRET-Effizienz der nF Monomer und Dimer Nanoantenne mit 40 – und 80 nm Goldnanopartikel gemessen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4-20 dargestellt.

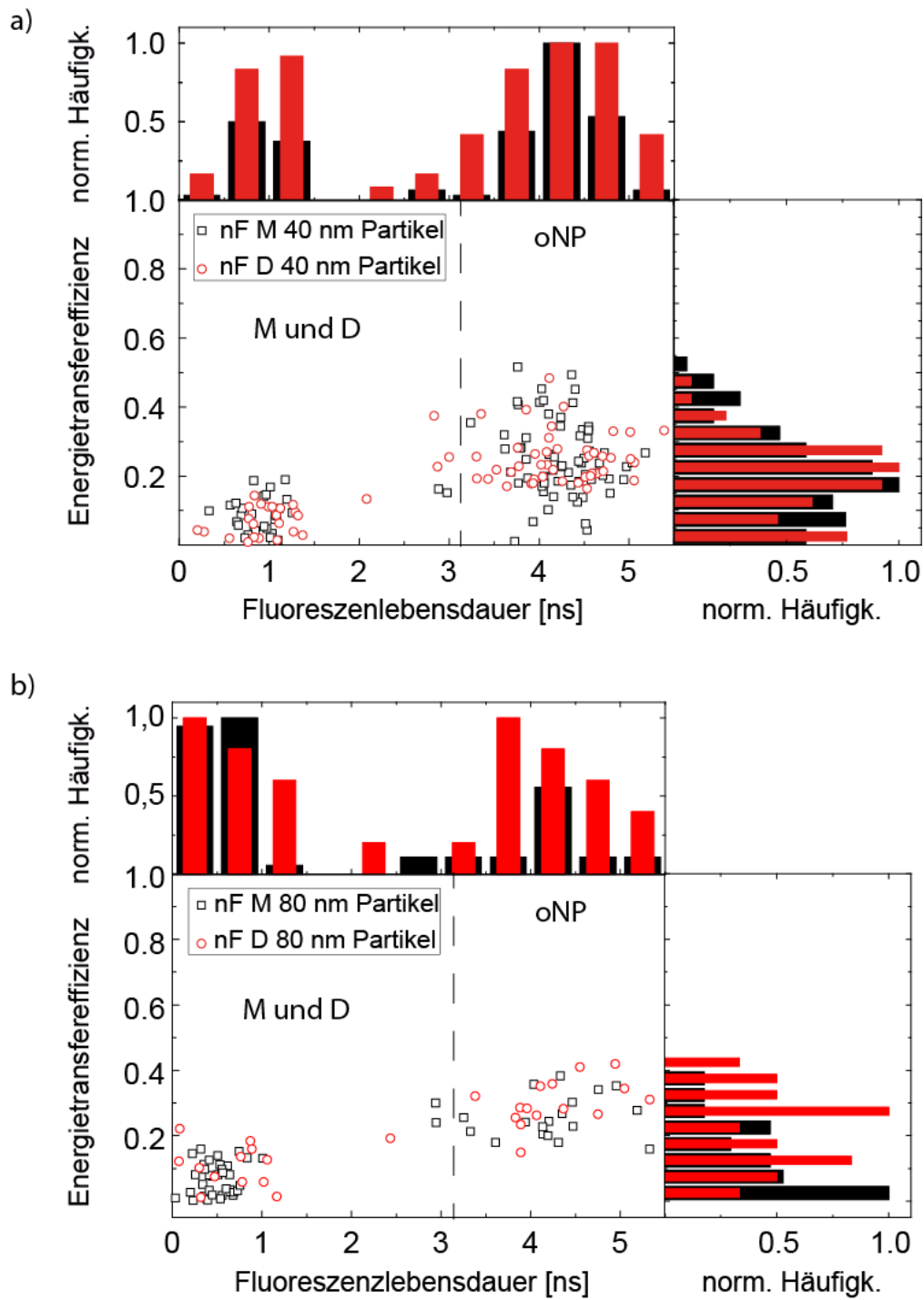
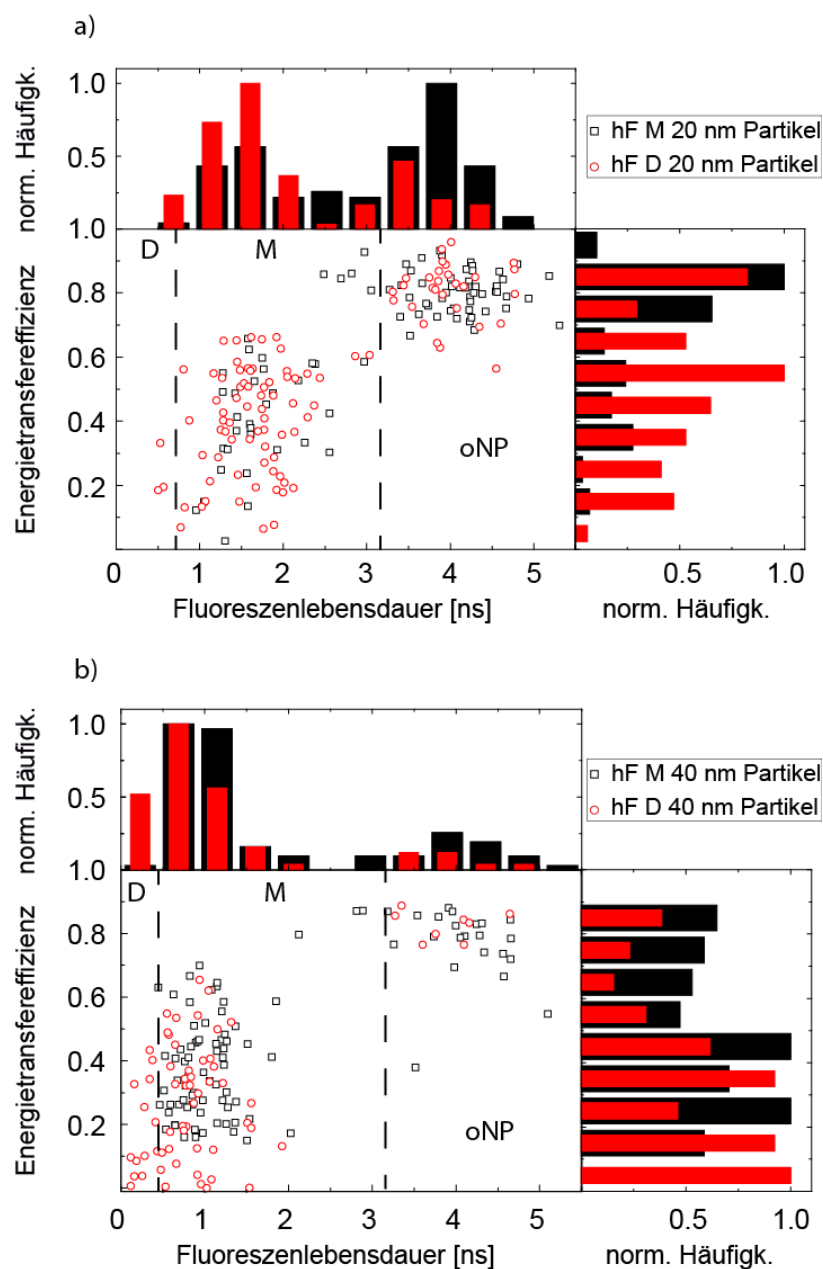


Abbildung 4-20: Aufgetragen ist die Fluoreszenzlebensdauer gegen die FRET-Effizienz für a) 40 nm Goldnanopartikel und b) 80 nm Goldnanopartikel. Zu erkennen sind zwei Populationen, eine ohne Nanopartikel (oNP) und eine mit Monomer und Dimer (M und D). Eine Unterscheidung zwischen der Monomer und Dimer Nanoantenne ist nicht möglich. Die FRET-Effizienz verringert sich, wenn Partikel angebunden sind. Die Fluoreszenzlebensdauer verringert sich erwartungsgemäß ebenfalls. In Zusammenarbeit mit Johann Bohlen<sup>93</sup>

In Anwesenheit von Goldnanopartikeln wird die FRET-Effizienz verringert. Eine Unterscheidung zwischen der Monomer und der Dimer Population ist nicht möglich. Anhand der Fluoreszenzlebensdauer sind zwei Fraktionen erkennbar, eine mit Nanopartikel und eine ohne Nanopartikel (oNP).

Im nächsten Experiment wurde die FRET-Effizienz der Monomer und Dimer hF Nanoantenne bestimmt. Es wurden Partikel der Größen 20 nm, 40 nm und 80 nm verwendet. Die Ergebnisse der Messungen sind in der Abbildung 4-21 dargestellt:



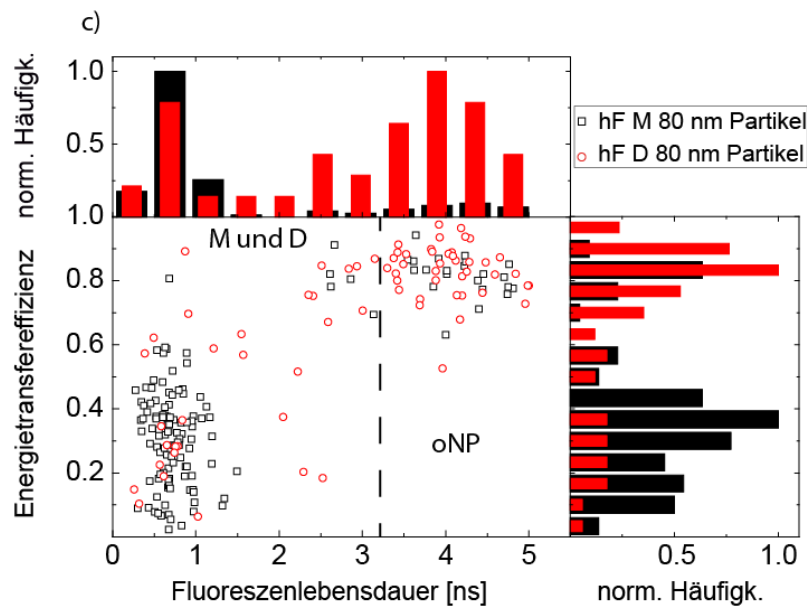


Abbildung 4-21: Abgebildet sind die Ergebnisse der FRET Messungen der hF-Probe mit a) 20 nm Partikel, b) 40 nm Partikel und c) 80 nm Partikel. Bei a) und b) sind drei Populationen zu erkennen. Bei c) ist wiederum keine Unterscheidung zwischen der Monomer und Dimer Population möglich. Bei allen drei Messungen ist eine Reduzierung der FRET-Effizienz zu erkennen. Die Fluoreszenzlebensdauer nimmt mit zunehmender Größe der Partikel ab. In Zusammenarbeit mit Johann Bohlen<sup>93</sup>.

Bei den 20 nm und 40 nm Partikeln sind drei Populationen erkennbar. Eine ohne Partikel (oNP), eine mit nur einem Partikel (M) und eine mit zwei Partikeln (D). Bei der hF Nanoantenne mit 80 nm Partikeln ist keine Unterscheidung zwischen der Monomer und Dimer Probe möglich. Die Fluoreszenzlebensdauer verringert sich wie erwartet mit zunehmender Partikelgröße.

### 4.2.1 Einfluss der Goldnanopartikel auf die Fluoreszenzlebensdauer

Die gemessenen Fluoreszenzlebensdauern sämtlicher Proben von ATTO 647N sind in Tabelle 4-5 zusammengefasst.

Tabelle 4-5: Dargestellt ist die gemessene Fluoreszenzlebensdauer von ATTO 647N von der Monomer / Dimer nF-Probe mit 20 und 40 nm Goldnanopartikel. Zum Vergleich dienen die Monomer / Dimer hF-Proben mit 20, 40 und 80 nm Nanopartikeln und den Referenzwerten.

Fluoreszenzlebensdauer ATTO 647N [ns]				
Probe	Monomer	Dimer	oNP	Referenz
nF – 40 nm Monomer	$0,93 \pm 0,04$	-	$4,29 \pm 0,05$	$4,57 \pm 0,04$
nF – 80 nm Dimer	$0,49 \pm 0,02$	-		
hf – 20 nm Monomer	$1,51 \pm 0,08$	-	$4,13 \pm 0,10$	$4,08 \pm 0,06$
hf – 20 nm Dimer	$1,42 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,16$	$4,35 \pm 0,61$	
hf – 40 nm Monomer	$0,96 \pm 0,04$	-	$4,12 \pm 0,22$	
hf – 40 nm Dimer	$0,99 \pm 0,05$	$0,46 \pm 0,09$	$3,92 \pm 0,36$	
hf – 80 nm Monomer	$0,66 \pm 0,01$	-	$4,34 \pm 0,79$	
hf – 80 nm Dimer	-	-	$3,87 \pm 0,15$	

Die Fluoreszenzlebensdauer wird wie erwartet in Anwesenheit der Goldnanopartikel reduziert. Bei den Monomer nF/hF-Proben sind die Fluoreszenzlebensdauern bei den 40 nm Partikeln nahezu identisch. Die hF-Monomer Probe mit 20 nm Partikeln weist eine höhere Fluoreszenzlebensdauer auf als die Probe mit 40 nm Partikeln. Die Dimer Proben besitzen die kürzeste Fluoreszenzlebensdauer. Nach Gleichung 2.20 wird die Fluoreszenzlebensdauer durch die nicht-radiative Rate beeinflusst. Durch die Erhöhung dieser Rate wird die Fluoreszenzlebensdauer verkürzt <sup>19,76</sup>.

### 4.2.2 Einfluss der Goldnanopartikel auf den FRET

Bei den nF-Proben konnte bereits der Trend zu einer Verringerung der FRET-Effizienz beobachtet werden. Aufgrund des niedrigen FRET-Wertes von 0,3 ohne Partikel ist eine genaue Aussage über die Änderung der FRET-Effizienz nicht möglich. Für die weitere Diskussion werden nur die Werte der hF-Proben berücksichtigt. Die gemessenen Werte der FRET-Effizienz sind in Tabelle 4-6 zusammengefasst:

Tabelle 4-6: Aufgelistet sind die gemessenen FRET-Werte der hF-Nanoantenne mit 20 -, 40- und 80 nm Goldnanopartikel. Mit steigendem Durchmesser der Partikelgröße verringert sich die FRET-Effizienz. Die Dimer Proben haben die niedrigste FRET-Effizienz. Die Referenzmessung stimmt mit den Proben ohne Nanopartikel überein.

FRET-Effizienz				
Probe	Monomer	Dimer	oNP	Referenz
hf – 20 nm Monomer	$0,53 \pm 0,17$	-	$0,82 \pm 0,01$	$0,82 \pm 0,01$
hf – 20 nm Dimer	$0,42 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,05$	$0,86 \pm 0,04$	
hf – 40 nm Monomer	$0,36 \pm 0,06$	-	$0,84 \pm 0,07$	
hf – 40 nm Dimer	$0,35 \pm 0,06$	$0,07 \pm 0,03$	$0,86 \pm 0,18$	
hf – 80 nm Monomer	$0,31 \pm 0,02$	-	$0,83 \pm 0,01$	
hf – 80 nm Dimer	-	-	$0,85 \pm 0,01$	

Die Werte der Proben ohne Partikel (oNP) stimmen mit dem zuvor bestimmten Referenzwert überein. Mit steigender Partikelgröße wird auch die FRET-Effizienz verringert. Diese Tendenz wird durch die Messung bestätigt. Die E-Werte sind nicht homogen verteilt, wie bei den Proben ohne Partikel. Die heterogene Verteilung der FRET-Effizienzen kann durch mehrere Phänomene erklärt werden:

- Orientierung des Farbstoffes zum elektrischen Feld der Nanopartikel: Im Idealfall ist die Ausrichtung des Dipolmoments vom Farbstoff parallel zum Partikel. Härtling et.al. untersuchten den Einfluss der Quantenausbeute, die Änderung der Anregungsrate und die Änderung der Fluoreszenzrate auf verschiedene Dipolorientierung zum Nanopartikel (siehe Abb. 4-22.)<sup>94</sup>.



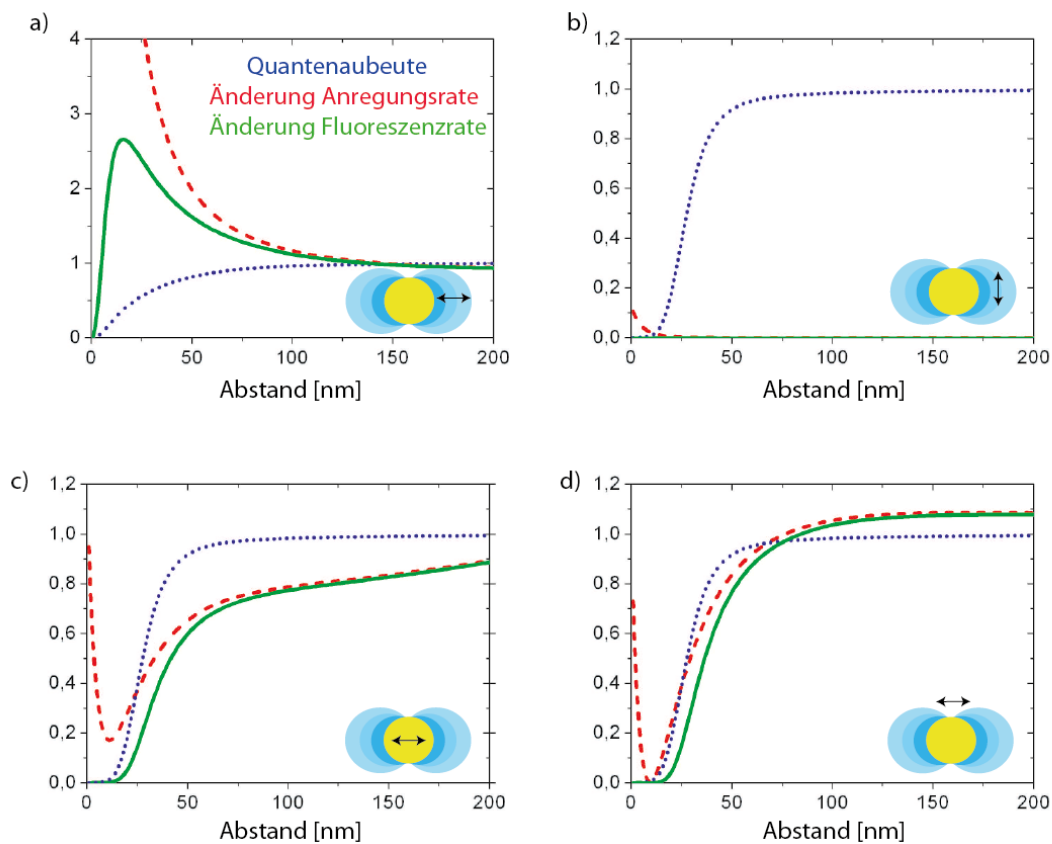


Abbildung 4-22: Aufgetragen ist die Quantenausbeute und die Änderungen der Anregungs- und Fluoreszenzrate in Abhängigkeit des Abstands zwischen einem 80 nm Goldnanopartikels und einem Fluorophor (Dipol) mit einer Quantenausbeute = 1. Die Anregungswellenlänge beträgt  $\lambda_{\text{Exc}} = 532 \text{ nm}$  und die Dipolemission  $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$ . In a-d sind die verschiedenen möglichen Dipol Orientierung zum elektrischen Feld des Goldnanopartikels aufgetragen (verändert nach <sup>94</sup>).

Es konnte gezeigt werden, dass wenn die Orientierung vom Idealfall abweicht, sich die verschiedenen Raten ändern. Außerdem kann nicht immer garantiert werden, dass die Nanoantenne gerade auf der Oberfläche immobilisiert ist.

- Die Form der Partikel: Im Idealfall sollten die Partikel perfekt sphärisch rund sein. Dies kann aber nicht immer garantiert werden. Weichen die Formen ab, ändert sich auch das elektrische Feld des Partikels und sorgt dafür für einen unterschiedlichen starken Einfluss auf die Fluorophore. In der Abbildung 4-23 sind TEM-Aufnahmen von den hier verwendeten Goldnanopartikeln.

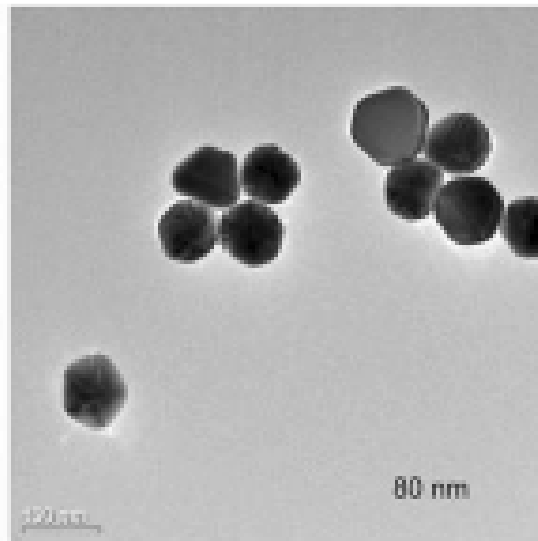


Abbildung 4-23: TEM-Aufnahmen von 80 nm Goldnanopartikel. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Partikel nicht perfekt rund sind. Wiedergabe aus Lit.[<sup>19</sup>] mit Genehmigung der AAAS

- Abstand der Fluorophore zu den Partikeln: Die DNA-Nanoantenne besitzt wie schon erwähnt drei Anbindestellen für die funktionalisierten Goldnanopartikel. Durch die Anbindung kann es zu unterschiedlichen Abständen zwischen den Fluorophoren und den Goldnanopartikeln kommen. Diese minimalen Abstandsänderungen liefern ebenfalls ein Grund für die breite Verteilung der FRET-Effizienzen.

In allen Experimenten wurde eine Verringerung der FRET-Effizienzen gemessen. Dies steht im Einklang mit den in der Literatur vorhandenen Werten<sup>60,95–97</sup>. Es ist davon auszugehen, dass der Akzeptor und auch die Nanopartikel für eine Erhöhung der nicht-radialen des Donors verantwortlich sind. Der Einfluss auf den Donor basiert jedoch nicht auf der Summe der Paarweisen Interaktion zwischen Donor-Akzeptor und Donor-Nanopartikel<sup>95</sup>.

Zur besseren Übersicht ist die komplette Messreihe in Abb. 4-24 dargestellt. Ein weiterer wichtiger Punkt stellt die Änderung der FRET-Rate in Anwesenheit der Nanopartikel dar. Aus den hier gewonnen Daten kann eine Vermutung über die Änderung der FRET-Rate

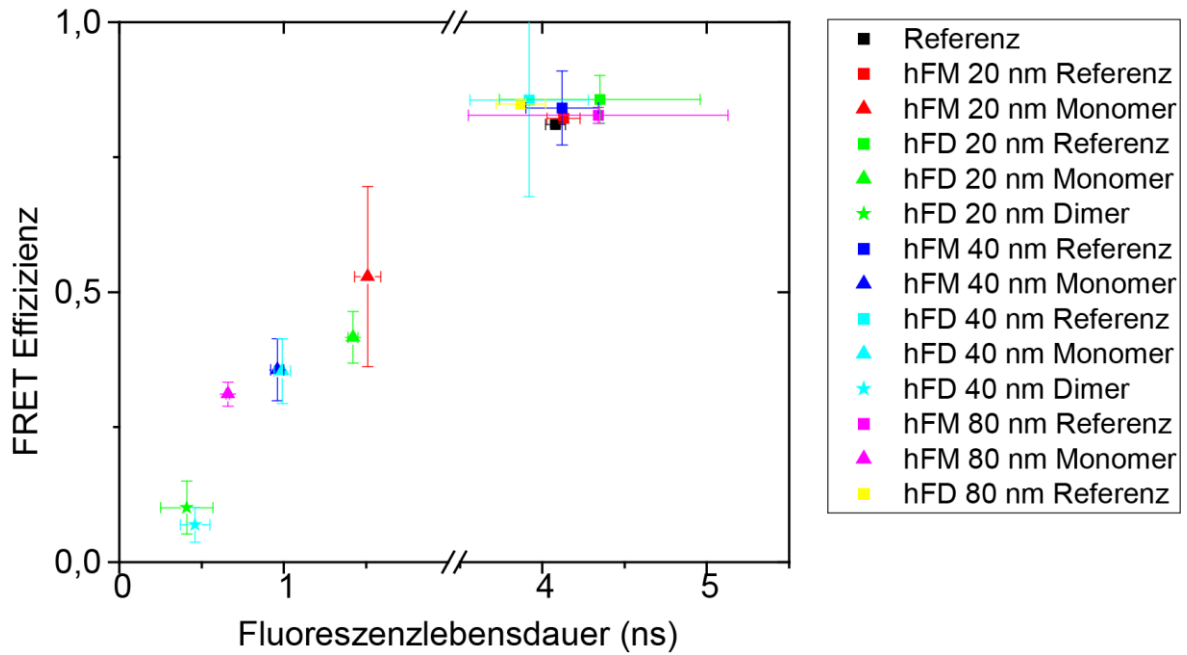


Abbildung 4-24: Aufgetragen ist die Fluoreszenzlebensdauer von ATTO 647N gegen die FRET-Effizienz. Die Fehlerbal-  
ken berechnen sich aus der Abweichung der Gauß-Funktion aus den Histogrammregressionen. Die Referenzwerte  
bzw. die Proben ohne Partikel besitzen die gleiche Fluoreszenzlebensdauer sowie die gleiche FRET-Effizienz. Die Ten-  
denz für eine Verringerung FRET-Effizienz bei zunehmender Partikelgröße wird mit diesem Graphen nochmals ver-  
deutlicht. Die Fluoreszenzlebensdauern verringern sich ebenfalls mit zunehmender Partikelgröße. In Zusammenarbeit  
mit Johann Bohlen<sup>93</sup>.

aufgestellt werden. Dazu werden die Gleichungen 2.9 und 2.8 durcheinander geteilt. Es  
ergibt sich folgende Gleichung:

$$\frac{I_{DA}}{I_D} = \frac{\frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_{ET}}}{\frac{k_r}{k_r + k_{nr}}} = \frac{1}{\frac{k_r + k_{nr} + k_{ET}}{k_r + k_{nr}}} \quad 4-1$$

Mit der Fluoreszenzlebensdauer nach Gleichung 2.3 wird die obige Gleichung zu:

$$a = \frac{I_{DA}}{I_D} = \frac{1}{1 + k_{ET} \cdot \tau_D} \quad 4-2$$

Durch Umformung der Gleichung nach  $k_{ET}$  kann die FRET-Rate über die Donorintensität  
in Anwesenheit und Abwesenheit des Akzeptors sowie der Fluoreszenzlebensdauer des  
Donors bestimmt werden:

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau_D} \cdot \frac{1-a}{a} \quad 4-3$$

Um die Veränderung zu berechnen wird die Rate durch die erhaltene Rate in Anwesenheit eines Partikels  $k_{ET}'$  geteilt:

$$\frac{k_{ET}'}{k_{ET}} = \frac{(1-a') \cdot a}{a' \cdot (1-a)} \cdot \frac{\tau_D}{\tau_D'} = b \cdot \frac{\tau_D}{\tau_D'} \quad 4-4$$

In der obigen Gleichung stellt ' die Anwesenheit eines Nanopartikels dar. Die ersten Berechnungen zeigen, dass der Vorfaktor  $b$  mit der Größe der Nanopartikel abnimmt. Die Fluoreszenzlebensdauer des Donors wird ebenfalls abnehmen, so dass wahrscheinlich keine große Veränderung der FRET-Rate zu erwarten ist. In einigen Studien wird davon ausgegangen, dass die FRET-Rate durch die Modifizierung des elektrischen Feldes des Nanopartikels, beeinflusst werden kann<sup>55,60,82</sup>. Interessant ist auch der Einfluss der lokalen Zustandsdichten (LDOS<sup>11</sup>) von den Photonen. Auch hier wird kontrovers darüber diskutiert, ob die FRET-Rate linear abhängig vom LDOS ist<sup>59,60,82</sup> oder nicht<sup>98</sup>. Die Rate der spontanen Emission bei FRET ist dabei proportional zum LDOS bei der Emissionsfrequenz eines angeregten Moleküls. Die FRET-Rate hängt dabei von der Emissionsfrequenz und den verschiedenen photonischen Zuständen ab.

---

<sup>11</sup> LDOS: local photon density of states: lokale Zustandsdichten von Photonen. Es beschreibt die verschiedenen Zustände, welche ein Photon einnehmen kann.

## 5. Ausblick

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine Methode entwickelt, um die Beladungsquote der ZMWs mit einzelnen Molekülen zu erhöhen. Bei der konventionellen Methode wird die Polymerase stochastisch in den ZMWs angebunden. Daraus resultierte nur eine maximale Beladungsquote von 37 % mit einzelnen Polymerasen. Hinzu kommt die räumliche Anordnung der Polymerase in der Nanoapertur. Diese sollte möglichst mittig sein, um ein homogenes Fluoreszenzsignal zu erhalten. Aus diesem Grund wurden auf Basis der DNA-Origami Technik, Nanoadapter entwickelt, welche die Beladung auf über 60 % steigern konnte. Durch diese Technik, können die ZMWs ohne großen Aufwand parallel beladen werden. Ein wichtiger Aspekt für den zukünftigen Einsatz ist die vollständige Beladung der Nanoaperturen. Durch eine eventuelle Modifizierung der funktionalisierten Oberfläche ist es eventuell möglich, die Neutravidin-Dichte noch weiter zu erhöhen, um die Bindungswahrscheinlichkeit mit den Biotin-Molekülen zu steigern. Als nächster Schritt sollte auch die Anbindung der Polymerase an den Nanoadaptern erfolgen, um diese als universelles Transportsystem für verschiedene Biomoleküle zu bestätigen. Das Fluoreszenzsignal der Farbstoffmoleküle in den Aperturen wurde bis zu einem Faktor von 10 reduziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Entfernung der Oberflächenmodifikation für eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals sorgt. Eventuell ist eine Oberflächenmodifikation denkbar, welche die Areale für eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals freigibt. Zum Schluss sollte eine Prozedur ausgearbeitet werden, um den Einsatz in den PacBio-Sequenzierer© zu ermöglichen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine DNA-Origami Nanoantenne so modifiziert, dass die Untersuchung des FRET-Mechanismus in Anwesenheit von Goldnanopartikel näher untersucht werden konnte. Die Ergebnisse zeigen eine Verringerung der FRET-Effizienz mit zunehmender Größe der Goldnanopartikel. Um den Einfluss auf die FRET-Rate näher zu untersuchen, ist die Messung der Fluoreszenzlebensdauer des Donors erforderlich. Durch den Einfluss der Goldnanopartikel und des Energietransfers auf den Akzeptor wird die Fluoreszenzlebensdauer vom Donor stark verkürzt, so dass diese Messung sich als sehr schwierig gestalten könnte. Um der breiten Verteilung der FRET-Werte entgegen

zu wirken, sollte auch der Einsatz von Silbernanopartikeln diskutiert werden. Das Extinktionsspektrum der Silbernanopartikel ist mehr in den grünen Wellenlängenbereich verschoben. Dadurch würde nur der Donor mehr beeinflusst werden. Auch die Formen der Partikel können verändert werden, um die Messung zu optimieren.

Ein interessanter Punkt ist der Energieübertrag durch ein Gold/Silber-Nanopartikel auf ein anderes Farbstoffmolekül (siehe Abbildung 5-1). Durch diese Anordnung ist es eventuell möglich, die Energie durch den gesamten Durchmesser des Partikels und über eine größere Distanz zu übertragen.

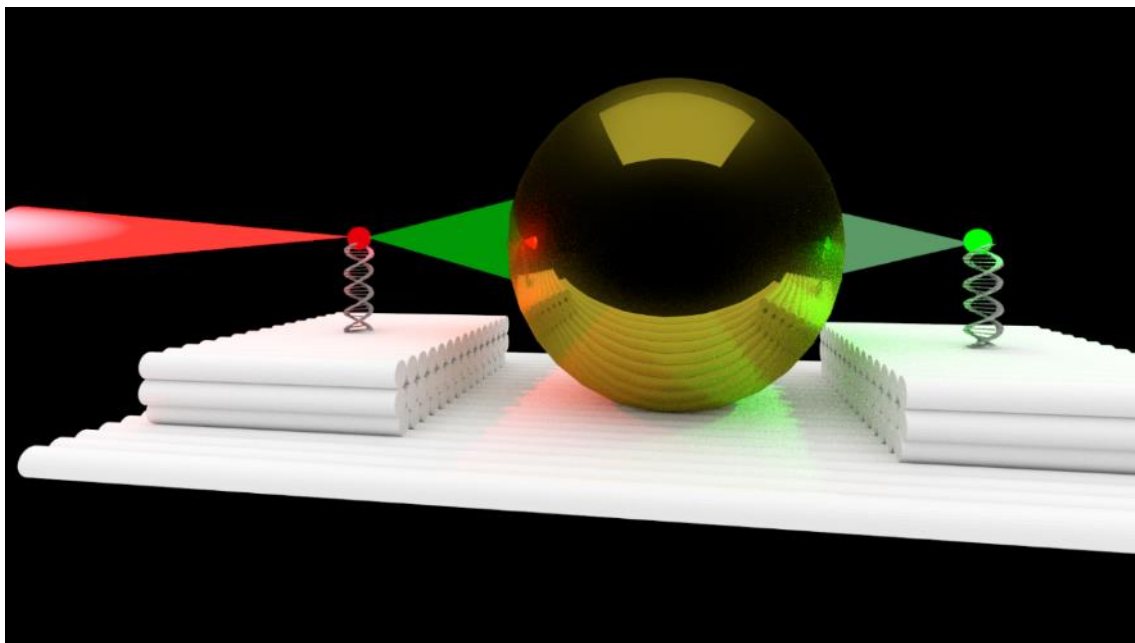


Abbildung 5-1: Dargestellt ist ein DNA-Origami Konstrukt mit einem Donor-Akzeptor Paar, welches durch mittig angeordnetem Goldnanopartikel getrennt ist. Der Partikel fungiert als Überträger der strahlungslosen Energie vom Donor zum Akzeptor.

Dabei sollte der Abstand der beiden Farbstoffmoleküle größer als 15 nm betragen, damit kein FRET Übergang direkt zwischen den Farbstoffmolekülen möglich ist. Wichtig ist zu untersuchen, ob nicht nur der Energieübertrag vom Donor auf dem Partikel möglich ist, sondern auch vom Partikel auf den Akzeptor.

## 6. Literaturverzeichnis

- (1) Reece, J. B.; Campbell, N. A. *Campbell biology*, 9. ed.; Cummings: Boston, Mass., 2011.
- (2) Hell, S. W.; Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780.
- (3) Hell, S. W. Far-field optical nanoscopy. *Science* **2007**, *316*, 1153–1158.
- (4) Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv f. mikrosk. Anatomie* **1873**, *9*, 418–440.
- (5) Betzig, E.; Lewis, A.; Harootunian, A.; Isaacson, M.; Kratschmer, E. Near Field Scanning Optical Microscopy (NSOM). *Biophysical Journal* **1986**, *49*, 269–279.
- (6) Eric Betzig, George H. Patterson, Rachid Sougrat, . Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science* **2006**, *313*, 1642–1645.
- (7) The Nobel Prize in Chemistry 2014". Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2014/](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/).
- (8) Binnig, G.; Rohrer, H.; Gerber, C.; Weibel, E. Tunneling through a controllable vacuum gap. *Appl. Phys. Lett.* **1982**, *40*, 178–180.
- (9) Binnig; Quate; Gerber. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* **1986**, *56*, 930–933.
- (10) Brooks Shera, E.; Seitzinger, N. K.; Davis, L. M.; Keller, R. A.; Soper, S. A. Detection of single fluorescent molecules. *Chemical Physics Letters* **1990**, *174*, 553–557.
- (11) Hirschfeld, T. Optical microscopic observation of single small molecules. *Applied optics* **1976**, *15*, 2965–2966.
- (12) Tinnefeld, P. Single-molecule detection: Breaking the concentration barrier. *Nature nanotechnology* **2013**, *8*, 480–482.
- (13) Holzmeister, P.; Acuna, G. P.; Grohmann, D.; Tinnefeld, P. Breaking the concentration limit of optical single-molecule detection. *Chem Soc Rev* **2014**, *43*, 1014–1028.
- (14) Novotny, L.; Hecht, B. *Principles of nano-optics*, 2. ed.; Cambridge Univ. Press: Cambridge, 2012.
- (15) Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *P Natl Acad Sci USA P Natl Acad Sci USA* **1977**, *74*, 5463–5467.

- (16) Wetterstrand KA. DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP). [www.genome.gov/sequencingcostsdata](http://www.genome.gov/sequencingcostsdata) (accessed September 1, 2017).
- (17) Korlach, J.; Bjornson, K. P.; Chaudhuri, B. P.; Cicero, R. L.; Flusberg, B. A.; Gray, J. J.; Holden, D.; Saxena, R.; Wegener, J.; Turner, S. W. Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Single Molecule Tools: Fluorescence Based Approaches, Part A*; Methods in Enzymology; Elsevier, 2010; pp 431–455.
- (18) Eid, J.; Fehr, A.; Gray, J.; Luong, K.; Lyle, J.; Otto, G.; Peluso, P.; Rank, D.; Baybayan, P.; Bettman, B. *et al.* Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science* **2009**, *323*, 133–138.
- (19) Acuna, G. P.; Moller, F. M.; Holzmeister, P.; Beater, S.; Lalkens, B.; Tinnefeld, P. Fluorescence enhancement at docking sites of DNA-directed self-assembled nanoantennas. *Science* **2012**, *338*, 506–510.
- (20) Anger, P.; Bharadwaj, P.; Novotny, L. Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 113002.
- (21) Heucke, S.; Baumann, F.; Acuna, G. P.; Severin, P. M.; Stahl, S. W.; Strackharn, M.; Stein, I.; Altpeter, P.; Tinnefeld, P.; Gaub, H. E. Placing individual molecules in the center of nanoapertures. *Nano Lett* **2013**, DOI: 10.1021/nl401517a.
- (22) Rothmund, P. W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* **2006**, *440*, 297–302.
- (23) Douglas, S. M.; Dietz, H.; Liedl, T.; Hogberg, B.; Graf, F.; Shih, W. M. Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature* **2009**, *459*, 414–418.
- (24) Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **1948**, *437*, 55–75.
- (25) Gietl, A.; Holzmeister, P.; Blombach, F.; Schulz, S.; Voithenberg, L. V. von; Lamb, D. C.; Werner, F.; Tinnefeld, P.; Grohmann, D. Eukaryotic and archaeal TBP and TFB/TF(II)B follow different promoter DNA bending pathways. *Nucleic acids research* **2014**, *42*, 6219–6231.
- (26) Schulz, S.; Gietl, A.; Smollett, K.; Tinnefeld, P.; Werner, F.; Grohmann, D. TFE and Spt4/5 open and close the RNA polymerase clamp during the transcription cycle. *P Natl Acad Sci USA P Natl Acad Sci USA* **2016**, *113*, E1816-25.



- (27) Stein, I. H.; Schuller, V.; Bohm, P.; Tinnefeld, P.; Liedl, T. Single-molecule FRET ruler based on rigid DNA origami blocks. *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 689–695.
- (28) Stein, I. H.; Steinhauer, C.; Tinnefeld, P. Single-molecule four-color FRET visualizes energy-transfer paths on DNA origami. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 4193–4195.
- (29) Lee, N. K.; Kapanidis, A. N.; Koh, H. R.; Korlann, Y.; Ho, S. O.; Kim, Y.; Gassman, N.; Kim, S. K.; Weiss, S. Three-color alternating-laser excitation of single molecules: monitoring multiple interactions and distances. *Biophysical Journal* **2007**, *92*, 303–312.
- (30) Yim, S. W.; Kim, T.; Laurence, T. A.; Partono, S.; Kim, D.; Kim, Y.; Weiss, S.; Reitmaier, A. Four-color alternating-laser excitation single-molecule fluorescence spectroscopy for next-generation biodetection assays. *Clinical chemistry* **2012**, *58*, 707–716.
- (31) Heilemann, M.; Kasper, R.; Tinnefeld, P.; Sauer, M. Dissecting and reducing the heterogeneity of excited-state energy transport in DNA-based photonic wires. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 16864–16875.
- (32) Heilemann, M.; Tinnefeld, P.; Sanchez Mosteiro, G.; Garcia Parajo, M.; van Hulst, N. F.; Sauer, M. Multistep energy transfer in single molecular photonic wires. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 6514–6515.
- (33) Onno Gabriele. Franck-Condon-Prinzip. <https://de.wikipedia.org/wiki/Franck-Condon-Prinzip>.
- (34) Cepheiden. Stokes-Verschiebung. <https://de.wikipedia.org/wiki/Stokes-Verschiebung>.
- (35) Gust, A.; Zander, A.; Gietl, A.; Holzmeister, P.; Schulz, S.; Lalkens, B.; Tinnefeld, P.; Grohmann, D. A starting point for fluorescence-based single-molecule measurements in biomolecular research. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2014**, *19*, 15824–15865.
- (36) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third Edition; Springer ebook collection / Chemistry and Materials Science 2005-2008; Springer Science+Business Media, LLC: Boston, MA, 2006.
- (37) Dale, R. E.; Eisinger, J.; Blumberg, W. E. The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophysical Journal* **1979**, *26*, 161–193.

- (38) Enderlein, J. Modification of forster resonance energy transfer efficiency at interfaces. *International Journal of Molecular Sciences* **2012**, *13*, 15227–15240.
- (39) Bethe, H. A. Theory of Diffraction by Small Holes. *Phys. Rev.* **1944**, *66*, 163–182.
- (40) Genet, C.; Ebbesen, T. W. Light in tiny holes. *Nature* **2007**, *445*, 39–46.
- (41) Levene, M. J.; Korlach, J.; Turner, S. W.; Foquet, M.; Craighead, H. G.; Webb, W. W. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science* **2003**, *299*, 682–686.
- (42) Korlach, J.; Marks, P. J.; Cicero, R. L.; Gray, J. J.; Murphy, D. L.; Roitman, D. B.; Pham, T. T.; Otto, G. A.; Foquet, M.; Turner, S. W. Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nanostructures. *P Natl Acad Sci USA P Natl Acad Sci USA* **2008**, *105*, 1176–1181.
- (43) Zhu, P.; Craighead, H. G. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis. *Annu Rev Biophys* **2012**, *41*, 269–293.
- (44) Sailor, M. J.; Park, J.-H. Hybrid nanoparticles for detection and treatment of cancer. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **2012**, *24*, 3779–3802.
- (45) Hu, R.; Zheng, M.; Wu, J.; Li, C.; Shen, D.; Yang, D.; Li, L.; Ge, M.; Chang, Z.; Dong, W. Core-Shell Magnetic Gold Nanoparticles for Magnetic Field-Enhanced Radio-Photothermal Therapy in Cervical Cancer. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* **2017**, *7*, DOI: 10.3390/nano7050111.
- (46) Acuna, G. P.; Holzmeister, P.; Moller, F. M.; Beater, S.; Lalkens, B.; Tinnefeld, P. DNA-templated nanoantennas for single-molecule detection at elevated concentrations. *J Biomed Opt* **2013**, *18*, 65001.
- (47) Pellegrotti, J. V.; Acuna, G. P.; Puchkova, A.; Holzmeister, P.; Gietl, A.; Lalkens, B.; Stefani, F. D.; Tinnefeld, P. Controlled reduction of photobleaching in DNA origami-gold nanoparticle hybrids. *Nano letters* **2014**, *14*, 2831–2836.
- (48) Puchkova, A.; Vietz, C.; Pibiri, E.; Wunsch, B.; Sanz Paz, M.; Acuna, G. P.; Tinnefeld, P. DNA Origami Nanoantennas with over 5000-fold Fluorescence Enhancement and Single-Molecule Detection at 25  $\mu$ M. *Nano letters* **2015**, *15*, 8354–8359.
- (49) Vietz, C.; Lalkens, B.; Acuna, G. P.; Tinnefeld, P. Functionalizing large nanoparticles for small gaps in dimer nanoantennas. *New J. Phys.* **2016**, *18*, 45012.

- (50) Coronado, E. A.; Encina, E. R.; Stefani, F. D. Optical properties of metallic nanoparticles: manipulating light, heat and forces at the nanoscale. *Nanoscale* **2011**, *3*, 4042–4059.
- (51) Taminiau, T. H.; Stefani, F. D.; Segerink, F. B.; van Hulst, N. F. Optical antennas direct single-molecule emission. *Nature Photon* **2008**, *2*, 234–237.
- (52) Taminiau, T. H.; Stefani, F. D.; van Hulst, N. F. Single emitters coupled to plasmonic nano-antennas: angular emission and collection efficiency. *New Journal of Physics* **2008**, *10*, 105005.
- (53) Bharadwaj, P.; Deutsch, B.; Novotny, L. Optical Antennas. *Adv. Opt. Photon.* **2009**, *1*, 438.
- (54) Novotny, L.; van Hulst, N. Antennas for light. *Nature Photon* **2011**, *5*, 83–90.
- (55) Ghenuche, P.; Mivelle, M.; Torres, J. de; Moparthy, S. B.; Rigneault, H.; van Hulst, N. F.; Garcia-Parajo, M. F.; Wenger, J. Matching Nanoantenna Field Confinement to FRET Distances Enhances Forster Energy Transfer Rates. *Nano Lett* **2015**, *15*, 6193–6201.
- (56) Punj, D.; Ghenuche, P.; Moparthy, S. B.; Torres, J. de; Grigoriev, V.; Rigneault, H.; Wenger, J. Plasmonic antennas and zero-mode waveguides to enhance single molecule fluorescence detection and fluorescence correlation spectroscopy toward physiological concentrations. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* **2014**, *6*, 268–282.
- (57) Acuna, G. P.; Bucher, M.; Stein, I. H.; Steinhauer, C.; Kuzyk, A.; Holzmeister, P.; Schreiber, R.; Moroz, A.; Stefani, F. D.; Liedl, T. *et al.* Distance dependence of single-fluorophore quenching by gold nanoparticles studied on DNA origami. *ACS Nano* **2012**, *6*, 3189–3195.
- (58) Bharadwaj, P.; Novotny, L. Spectral dependence of single molecule fluorescence enhancement. *Opt Express* **2007**, *15*, 14266–14274.
- (59) Andrew, P. Forster Energy Transfer in an Optical Microcavity. *Science* **2000**, *290*, 785–788.
- (60) Ghenuche, P.; Torres, J. de; Moparthy, S. B.; Grigoriev, V.; Wenger, J. Nanophotonic enhancement of the Forster resonance energy-transfer rate with single nanoapertures. *Nano Lett* **2014**, *14*, 4707–4714.

- (61) WATSON, J. D.; CRICK, F. H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- (62) Seeman, N. C. Nucleic acid junctions and lattices. *Journal of Theoretical Biology* **1982**, *99*, 237–247.
- (63) Saccà, B.; Niemeyer, C. M. DNA-Origami: Die Kunst, DNA zu falten. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 60–69.
- (64) Seeman, N. C. DNA in a material world. *Nature* **2003**, *421*, 427–431.
- (65) Schmied, J. J.; Raab, M.; Forthmann, C.; Pibiri, E.; Wünsch, B.; Dammeyer, T.; Tinnefeld, P. DNA origami-based standards for quantitative fluorescence microscopy. *Nature protocols* **2014**, *9*, 1367–1391.
- (66) Schmied, J. J.; Forthmann, C.; Pibiri, E.; Lalkens, B.; Nickels, P.; Liedl, T.; Tinnefeld, P. DNA Origami Nanopillars as Standards for Three-Dimensional Superresolution Microscopy. *Nano Lett.* **2013**, *13*, 781–785.
- (67) Erdmann, R.; Enderlein, J.; Wahl, M. *Time correlated single-photon counting and fluorescence spectroscopy*, 1. Aufl.; Wiley-VCH: Weinheim, Bergstr, 2005.
- (68) Wedler, G.; Freund, H.-J. *Lehrbuch der physikalischen Chemie*, 6., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl.; Wiley VCH Lehrbuchkollektion 1; Wiley-VCH: Weinheim, 2012.
- (69) Martin, Y.; Williams, C. C.; Wickramasinghe, H. K. Atomic force microscope–force mapping and profiling on a sub 100-Å scale. *J. Appl. Phys.* **1987**, *61*, 4723.
- (70) Zhong, Q.; Inniss, D.; Kjoller, K.; Elings, V. B. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surface Science* **1993**, *290*, L688–L692.
- (71) Hansma, P. K.; Cleveland, J. P.; Radmacher, M.; Walters, D. A.; Hillner, P. E.; Bezannilla, M.; Fritz, M.; Vie, D.; Hansma, H. G.; Prater, C. B. *et al.* Tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Appl. Phys. Lett.* **1994**, *64*, 1738.
- (72) Pibiri, E.; Holzmeister, P.; Lalkens, B.; Acuna, G. P.; Tinnefeld, P. Single-molecule positioning in zeromode waveguides by DNA origami nanoadapters. *Nano letters* **2014**, *14*, 3499–3503.
- (73) Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* **1996**, *382*, 607–609.

- (74) Schmied, J. J.; Raab, M.; Forthmann, C.; Pibiri, E.; Wünsch, B.; Dammeyer, T.; Tinnefeld, P. DNA origami based standards for quantitative fluorescence microscopy. *Nature protocols* **2014**, *accepted*.
- (75) Tinnefeld, P.; Hertel, D. P.; Sauer, M. Photophysical dynamics of single molecules studied by spectrally-resolved fluorescence lifetime imaging microscopy (SFLIM). *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 7989–8003.
- (76) Holzmeister, P.; Pibiri, E.; Schmied, J. J.; Sen, T.; Acuna, G. P.; Tinnefeld, P. Quantum yield and excitation rate of single molecules close to metallic nanostructures. *Nature communications* **2014**, *5*, 5356.
- (77) Wenger, J.; Gérard, D.; Aouani, H.; Rigneault, H.; Lowder, B.; Blair, S.; Devaux, E.; Ebbesen, T. W. Nanoaperture-Enhanced Signal-to-Noise Ratio in Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 834–839.
- (78) Gérard, D.; Wenger, J.; Bonod, N.; Popov, E.; Rigneault, H.; Mahdavi, F.; Blair, S.; Dintinger, J.; Ebbesen, T. W. Nanoaperture-enhanced fluorescence: Towards higher detection rates with plasmonic metals. *Phys. Rev. B* **2008**, *77*, DOI: 10.1103/physrevb.77.045413.
- (79) Garcia-Vidal, F. J.; Martin-Moreno, L.; Ebbesen, T. W.; Kuipers, L. Light passing through subwavelength apertures. *Rev. Mod. Phys.* **2010**, *82*, 729–787.
- (80) Wenger, J.; Gérard, D.; Dintinger, J.; Mahboub, O.; Bonod, N.; Popov, E.; Ebbesen, T. W.; Rigneault, H. Emission and excitation contributions to enhanced single molecule fluorescence by gold nanometric apertures. *Opt. Express* **2008**, *16*, 3008.
- (81) Wenger, J.; Rigneault, H. Photonic Methods to Enhance Fluorescence Correlation Spectroscopy and Single Molecule Fluorescence Detection. *International Journal of Molecular Sciences* **2010**, *11*, 206–221.
- (82) Torres, J. de; Ghenuche, P.; Moparthy, S. B.; Grigoriev, V.; Wenger, J. FRET Enhancement in Aluminum Zero-Mode Waveguides. *ChemPhysChem* **2015**, *16*, 782–788.
- (83) Rigneault, H.; Capoulade, J.; Dintinger, J.; Wenger, J.; Bonod, N.; Popov, E.; Ebbesen, T. W.; Lenne, P.-F. Enhancement of Single-Molecule Fluorescence Detection in Subwavelength Apertures. *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, DOI: 10.1103/physrevlett.95.117401.

- (84) Gérard, D.; Gray, S. K. Aluminium plasmonics. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2015**, *48*, 184001.
- (85) Mahdavi, F.; Blair, S. Nanoaperture Fluorescence Enhancement in the Ultraviolet. *Plasmonics* **2010**, *5*, 169–174.
- (86) Martin, W. E.; Srijanto, B. R.; Collier, C. P.; Vosch, T.; Richards, C. I. A Comparison of Single-Molecule Emission in Aluminum and Gold Zero-Mode Waveguides. *The journal of physical chemistry. A* **2016**, *120*, 6719–6727.
- (87) Przybilla, F.; Degiron, A.; Genet, C.; Ebbesen, T.; Léon-Pérez, F. de; Bravo-Abad, J.; García-Vidal, F. J.; Martín-Moreno, L. Efficiency and finite size effects in enhanced transmission through subwavelength apertures. *Opt. Express* **2008**, *16*, 9571.
- (88) Naether, U.; Rivas, D. E.; Larenas, M. A.; Molina, M. I.; Vicencio, R. A. Fano resonances in waveguide arrays with saturable nonlinearity. *Optics letters* **2009**, *34*, 2721–2723.
- (89) Liu, Y.; Bishop, J.; Williams, L.; Blair, S.; Herron, J. Biosensing based upon molecular confinement in metallic nanocavity arrays. *Nanotechnology* **2004**, *15*, 1368–1374.
- (90) Popov, E.; Nevière, M.; Wenger, J.; Lenne, P.-F.; Rigneault, H.; Chaumet, P.; Bonod, N.; Dintinger, J.; Ebbesen, T. Field enhancement in single subwavelength apertures. *J. Opt. Soc. Am. A, JOSAA* **2006**, *23*, 2342–2348.
- (91) Fluorophores.org. Quantenausbeute Cy3B. <http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/419> (accessed February 20, 2017).
- (92) ATTO-TEC GmbH. Quantenausbeute Atto 532. [https://www.atto-tec.com/attotec-shop/product\\_info.php?language%20=en&info=p102\\_ATTO-532.html](https://www.atto-tec.com/attotec-shop/product_info.php?language%20=en&info=p102_ATTO-532.html) (accessed February 20, 2017).
- (93) Johann R. Bohlen. *Untersuchung der FRET Effizienz im Hotspot einer Nanoantenne*. Masterarbeit, 2016.
- (94) Härtling, T.; Reichenbach, P.; Eng, L. M. Near-field coupling of a single fluorescent molecule and a spherical gold nanoparticle. *Opt. Express* **2007**, *15*, 12806.
- (95) Aissaoui, N.; Moth-Poulsen, K.; Kall, M.; Johansson, P.; Wilhelmsson, L. M.; Albinsson, B. FRET enhancement close to gold nanoparticles positioned in DNA origami constructs. *Nanoscale* **2017**, *9*, 673–683.

(96) Bidault, S.; Devilez, A.; Ghenuche, P.; Stout, B.; Bonod, N.; Wenger, J. Competition between Förster Resonance Energy Transfer and Donor Photodynamics in Plasmonic Dimer Nanoantennas. *ACS Photonics* **2016**, *3*, 895–903.

(97) Gonzaga-Galeana, J. A.; Zurita-Sánchez, J. R. A revisitation of the Förster energy transfer near a metallic spherical nanoparticle: (1) Efficiency enhancement or reduction? (2) The control of the Förster radius of the unbounded medium. (3) The impact of the local density of states. *The Journal of chemical physics* **2013**, *139*, 244302.

(98) Blum, C.; Zijlstra, N.; Lagendijk, A.; Wubs, M.; Mosk, A. P.; Subramaniam, V.; Vos, W. L. Nanophotonic control of the Förster resonance energy transfer efficiency. *Phys Rev Lett* **2012**, *109*, 203601.

## 7. Anhang

### 7.1 FCS Messungen an ZMW durchgeführt durch Jerome Wenger:

#### **FCS on PacBio ZMW**

Fresnel Marseille 06/2014

#### **Experimental configuration**

Excitation 633nm, objective 40x 1.2NA water imm, pinhole 30 $\mu$ m, APD MPD-50 $\mu$ m, filter 650-690nm

Excitation power 40 $\mu$ W, linear polarization

Alexa Fluor 647 Confocal reference concentration diluted 100x ~65nM

Alexa Fluor 647 ZMW concentration ~6.5 $\mu$ M

First experiments performed on pure water, then on PBS 1x + 1% tween20

FCS analysis to derive the average number of molecules N, diffusion time  $t_d$  and count rate per molecule CRM = F/N.

Lifetime measurements with 50ps laser diode at 80MHz on PicoHarp300. IRF FWHM = 120ps

#### **Confocal reference, A647 in pure water**

	Total fluo. (kHz)	N	$t_d$ ( $\mu$ s)	CRM (kHz)	Lifetime (ns)
Day 1	142.1	29.0	70	4.9	1.0
Day 2	138.2	29.4	70	4.7	1.03
Day 3	140.1	29.2	71	4.8	1.05



**Initial ZMW measurements show very weak signal**

**ZMW 200nm, no treatment, A647 in pure water**

ZMW #	Total fluo. (kHz)	N	td (μs)	CRM (kHz)	Lifetime (ns)
1	0.55	0.13	3.7	4.2	
2	0.7	0.1	3.0	6.9	
3	0.95	0.14	6.6	6.8	680 bi exp
4	0.9	0.165	3.0	5.6	680 bi exp
5 (defect)	5.9	3.1	5.0	1.9	800 mono exp
6	0.6	0.1	2.0	6.2	
7	0.9	0.19	3.8	4.6	
8	0.5	0.12	2.4	4.3	
9	0.9	0.2	3.0	4.4	

Sample 5 has transmission much higher than other ZMW: fabrication defect.

Signal to noise quite low, background is ~0.2kHz on metal

TCPSCP decays show bi-exponential, can be due to metal background, signal very weak.

**ZMW 144nm, no treatment, A647 in pure water**

ZMW #	Total fluo. (kHz)	N	td (μs)	CRM (kHz)	Lifetime (ns)
1	0.35	--	--	--	
2	0.4	0.1	2.7	4.3	740 bi exp
3	0.4	0.1	1.9	4.1	630 bi exp
4	0.6	--	--	--	--

Almost no correlation detectable

**Improvement after surface cleaning with ethanol and UV**

**ZMW 200nm, cleaning ethanol + UV (2x), , A647 in pure water**

ZMW #	Total fluo. (kHz)	N	td (μs)	CRM (kHz)	Lifetime (ns)
1	8.4	--	--	--	
2	7.8	0.6	7.8 + 5ms	13.0	

FCS shows two characteristic times, sticking to metal

**ZMW 144nm, cleaning ethanol + UV (2x), , A647 in pure water**

ZMW #	Total fluo. (kHz)	N	td (μs)	CRM (kHz)	Lifetime (ns)
1	2.1	0.3	3 + 5ms	7	
2	2.7	0.1	3 + 5ms	9	

Idem sticking to metal

**Further surface cleaning improves fluorescence detected**

**ZMW 200nm, cleaning ethanol + UV (4x), , A647 in pure water**

ZMW #	Total fluo. (kHz)	N	td (μs)	CRM (kHz)	Lifetime (ns)
1	60	4	9 + 5ms	15	45ps + 0.7ns
2	9.0	--	--	--	
3	10	--	--	--	

FCS shows two characteristic times, sticking to metal

TCSPC decay has two clear characteristic times (no longer related to background): sticking induces quenching and short decay times

**PBS buffer and tween surfactant avoid sticking to metal, sample is cleaned more**

**ZMW 200nm, cleaning ethanol + UV (8x), , A647 in PBS 1x + 1% tween20**

ZMW #	Total fluo. (kHz)	N	td (μs)	CRM (kHz)	Lifetime (ns)
1	35.2	2	15	17.6	0.70
2	41.4	1.9	12	21.8	0.68
3	23.8	2	16	11.9	
4	46.9	1.7	12	27.6	
5	31.6	1.7	12	18.6	
6	43.4	1.8	11	24.1	

FCS shows only one diffusion time

TCSPC decay is single exponential

**ZMW 144nm, cleaning ethanol + UV (8x), , A647 in PBS 1x + 1% tween20**

ZMW #	Total fluo. (kHz)	N	td (μs)	CRM (kHz)	Lifetime (ns)
1	38.9	2.1	14	18.5	
2	36.4	2.0	13.2	18.2	0.660
3	25.2	1.7	12.7	14.8	0.645
4	33.4	1.9	12.7	17.6	
5	31.5	1.8	11.6	17.5	

FCS shows only one diffusion time

TCSPC decay is single exponential

**ZMW 100nm, cleaning ethanol + UV (8x), , A647 in PBS 1x + 1% tween20**

ZMW #	Total fluo. (kHz)	N	td (μs)	CRM (kHz)	Lifetime (ns)
1	4.1	0.8	10	5.1	
2	1.2	0.4	6	3.0	0.68
3	1.5	--	--	--	
4	3.9	0.6	6	6.6	0.72
5	1.2	0.6	15	2	

FCS shows only one diffusion time

TCSPC decay is single exponential

**Signal stabilizes after further cleaning**

**ZMW 200nm, cleaning ethanol + UV (12x), , A647 in PBS 1x + 1% tween20**

ZMW #	Total fluo. (kHz)	N	td (μs)	CRM (kHz)	Lifetime (ns)
1	42	2.1	14.7	20.0	0.68
2	43.4	2.1	14.7	21.1	0.68
3	38.4	2.0	14.4	19.2	
4	33.2	1.95	14.5	17.0	
5	22.8	1.4	10.2	16.2	
6	39.6	1.8	11.4	22.0	

**ZMW 100nm, cleaning ethanol + UV (12x), , A647 in PBS 1x + 1% tween20**

ZMW #	Total fluo. (kHz)	N	td (μs)	CRM (kHz)	Lifetime (ns)
1	2.7	0.6	10	4.5	0.72
2	5.3	0.7	8.3	7.6	0.74
3	2.9	0.6	9	4.8	
4	3.7	0.6	8	6.2	0.75
5	2.4	0.54	7	4.5	

FCS curve still quite noisy with 100nm ZMW. Good SNR quality with 200nm.

## 7.2 Sequenzen der verwendeten Oligos für die Nanodisk

Die Sequenzen gehen vom 5' zum 3' Ende

Sequenz	Länge (Basen)	Modifikation
TAGTAAAACGAGAAATAAGAGAGAGTACCTTTAATCGAAGAC	42	unmodifiziert
CTGAAAAGGTGGCACAATAAATATTTTCATATT	32	unmodifiziert
GCATAAAGTGCCACACAACA	20	unmodifiziert
TTAGATCTACAGCAAACCTTCGCATCAATAGG	31	unmodifiziert
AATCAAATTATCTCACCTGGACGTTAGTATTCGCATAACGCT	42	unmodifiziert
GAGTTATACCCAACGGCAAAGACATGCTTTCCTTT	35	unmodifiziert
CTGCGTGGCGTCAGGGCATTAAAGCGCTGGTTGCCCTTTGTC	42	unmodifiziert
ATATTTGCTCCCCGTATGGGGTCAAATCCTCTGGCCTTGAT	41	unmodifiziert
AGAGTGAAATCGAAGCGAAAATACATAACAACCGAT	35	unmodifiziert
GAAACAAACCTACCAATATCAAACCCTAAGCCAGC	35	unmodifiziert
TCAGTGACGTTGTAAGACAAAAGATTAA	28	unmodifiziert
GCGGGGATTTTCTTCTTCCATCTAAGA	28	unmodifiziert
ACGCGAGGTAGGAATTGTTCTCACC	28	unmodifiziert
GCAAAGCGACTATTCCTCAACAATACTGAGA	32	unmodifiziert
TATTATCGGTTTTGCAGAGGGAAGGTAATTACCAT	35	unmodifiziert
CAATAATTAACAACGGCGAAGCAAGTG	28	unmodifiziert
TCCATACTCAATGAGTTAGAGTCTGAGCTCCGGTGTGAAACCCAC-CAGT	49	unmodifiziert
TACAAATCGCTTGAATTTGCTTCTATCAAAAACTATAGTGA	42	unmodifiziert
TTGGTAAGGAGGTTGAACCGCCACCCTCCATAGTTGAAGACG	42	unmodifiziert
AGCACCAATATTGAAGTCTAATGAAGTCTTGACAGAC	36	unmodifiziert
CGTAAACAGCAAAAAAGCTGTATGCAGCCCTAGAG	35	unmodifiziert
CCCTTCTGACCTGATAGCCCTCGAATTATACAGTA	35	unmodifiziert
GGGCAAAGAATACTTTTGTAAATGTAGAGGGT	31	unmodifiziert
AGTATTAGACATAATACTATCTTTTTGGCAACTTG	35	unmodifiziert
AGCAACAAAAACCAAGATACAGTAGCTCAACATGTATTGCTGT-GAATCC	49	unmodifiziert
GAGCAGCGACGCAGTCAACATAAAAAACAATAGCTA	35	unmodifiziert
CTGGCGATTCCGGCTTTTGCAGACTTT	28	unmodifiziert
CCAATCACCGCGTTTGCAGTAGCGGTTTTCATCGG	35	unmodifiziert
CCTGGTCACTGCGTGATTGTGGTGTGAGTATTGCTTATCAA	42	unmodifiziert
TAGCGGTCTCGTTATGCGTTAGAAAATAC	28	unmodifiziert
GTTGTGCAGAAAAAAGATTG	20	unmodifiziert
TTACCCTGGATTGCCGAGCTTCAAAGCG	28	unmodifiziert
TAGCAATAATCAAACCAGAACTAAAAGATCAAAGG	35	unmodifiziert
TTTGAGGGCTCATTAACGGAATCATAATAAAGTAC	35	unmodifiziert
AATAAGACGAGCGTTTCACCACTGTTTG	28	unmodifiziert
CAGGAGTTATTTTCAGTAAGCGCTTGAAACAGCAA	35	unmodifiziert

TATTTTCGACCATTAATAGCGCGGAATCG	30	unmodifiziert
CTGAGGTGAGCGCCATTGATAGAA	24	unmodifiziert
ACGTTGGCGTCTGGTAAAACAATTGTGT	28	unmodifiziert
AACGTCAGGAAATTGCGTA	19	unmodifiziert
CGCTGGCAACTATCCTGAATTGATGATA	28	unmodifiziert
TCAGCGGGCGAATATTAACCAGGTGCGG	28	unmodifiziert
AGGGATTAAGGTTGTAACCAGGCTTCCGATAGGCAATGCCATGAA	45	unmodifiziert
GCGCTAGGCTAAACAAAAGCCATAAGGC	28	unmodifiziert
AATAGCAGGGAAGCCGCTCACTGCCCTTGTCTCGA	35	unmodifiziert
TCTCCGTGGGAGCGAGACGAAGGAAC	26	unmodifiziert
CTTGCCGGCCGGAAAATCGGTTGTACCGCCTCAGACGGAACAAC	44	unmodifiziert
CATTTTCTAGCATTGTTGTCGCGCAACA	28	unmodifiziert
CAATATCTGGTCAGAGGAGCATATCATCCATTATC	35	unmodifiziert
AATAGACGTTTCGATCTAACCTCATAGTACCGAGG	35	unmodifiziert
GCATACAGAATTATGGTTTACCAGCGCCAGAAACGTTGCCCTCA- CTCGC	49	unmodifiziert
ATGAGTATGTTTCTTCAGGCCGGAACGGTTTGCC	35	unmodifiziert
TAGAAGAATGCGTAATAATTTACAATGA	28	unmodifiziert
TCAATCCCATCGCGCCCCCGGTATGAGCCTATTTATCCATTGAG	44	unmodifiziert
AATCAGTAGCGACAGAATCAATCACCAATCTTGTC	35	unmodifiziert
TAAGAACAGTTGAGGGCAAGGGCGCGAG	28	unmodifiziert
GGAATTATTTTGCAAGTAGATATGCAAC	28	unmodifiziert
TAACAGAAGGCAAAAGAACCACGGTTCATATCACCGTC	38	unmodifiziert
AATCGCCAGCTCAACATGGTTGGAGTAA	28	unmodifiziert
GCCTCTTCGGAACCTGCAGGTCCATTA	28	unmodifiziert
TAAAGTATTGCGGAAAACAGTCAGGTCT	28	unmodifiziert
GAGCCGTCAATAGTTTACAACGAACGTTATTA	32	unmodifiziert
CCAACCTTATTTTCAAAGAGTAACGCATAGAACG	35	unmodifiziert
GCAGCAAATGAAAACACCGCCGAACTGAAAGCGTAATTATTCAGC	46	unmodifiziert
GCTAAACTTGAAAATCGCATTACGCCAG	28	unmodifiziert
CGATAGTAGGCCGCACCGCTTATAGGTC	28	unmodifiziert
TTTAGCGTCAGACTCATCTTTTACATAGGTTGAG	35	unmodifiziert
TAACGTCCCTGAATAGCTGATTTGCCCC	28	unmodifiziert
ATCGCGTTTTACGCTAAAACGATTCTGAACGAGT	35	unmodifiziert
TTCGCAATGCAGATAGAGGGGTGATTCTGGAAGT	35	unmodifiziert
AAATTTAAATCGCAGCAATACTGCAACA	28	unmodifiziert
AGCAGGCAACAAGATTTTTATAACCAAT	28	unmodifiziert
GGCCGAGGCAATTCATCTGGCTCAAATTGGGGGAT	35	unmodifiziert
CATTTTCTATCATAGAATCAGGCCAGAA	28	unmodifiziert
GCTAAGGGGGCCAAGCTAAAAATGCGCCGCC	31	unmodifiziert
GCGGGGTGCCCGGATGCTGGAATTAAC	28	unmodifiziert
TGAGGCCACCAGAGCCAGTAACAAGACCAGAGTTT	35	unmodifiziert
AACGGAATACCAAACCGAGGAGATGATCCGCT	32	unmodifiziert

CGGTGAACCAAGTTTGGGAAAATCGTGAGACGAAT	35	unmodifiziert
GAATTTTGTCTCAAGCCAGTGATGTGCT	28	unmodifiziert
CCACCACGAGCACGAGTATAACTGACCT	28	unmodifiziert
CAATAGGCAGTACAGCCAGGATCAGAAA	28	unmodifiziert
GTACTIONAACATCGAACATTGCAAGGAGTTTATAA	35	unmodifiziert
AATAAGAAATTAACATACTCACCAGCTG	28	unmodifiziert
GCAAGGCAAGATCGAGCAGCGTACAGAG	28	unmodifiziert
AGCTATTTTTGAGAAATGCAATGGTTTAGCGATT	35	unmodifiziert
TTGGATAGGGTTCCGAAGGGTGGTGAGGCGGTTT	34	unmodifiziert
TTTTTCCTTCATCACTTTAATCCTCATAACGCAAG	35	unmodifiziert
ATTCACCCTCATTACAGGACTTGTGAGCGAATGAA	35	unmodifiziert
CTCAGGCGTTCAGGCCACAGAGGATTTT	28	unmodifiziert
GTGGCACAGTCTTTCTGAGCAAAAGAAGAAACATCTCCTT	40	unmodifiziert
GAGTCTGTAGTGTCGTCTGCCACCGCAGGTC	32	unmodifiziert
CAGAGCAGATGAACAGCGTAAAGTAAAT	28	unmodifiziert
AAGGCTTATAATAGCAAGCCCGAGGGTCGAGGTGC	35	unmodifiziert
AAGCCTTTCATACAATTTAGGGCCAAAA	28	unmodifiziert
CTGTTATTCTGGCTTTTTACCGTTCCGCCGCGCCG	35	unmodifiziert
AACATGTTCTTACCTATAACGTTTATAA	28	unmodifiziert
CCTATATAAAAAAGACATATTCATGCAAAATATCGATA	38	unmodifiziert
CAAATCACAGAACGAAGATTCTTATGAC	28	unmodifiziert
CAAAATTCAATTACAATGCGCTGCAACAGTG	31	unmodifiziert
AACACACAAAGTACGCTGGCTAGTCTGGAAAGGCT	35	unmodifiziert
TTACGCACATATGAATTTGCGCTCAGATGATGACC	35	unmodifiziert
AACGGCCACCCTTTGACACCCGCCAGGGAGCTTTT	35	unmodifiziert
CCTGTCAATAAAAAAACAAGGGTAGCTGATGTC	37	unmodifiziert
AAATAATACAATAGACCCTAAGCGCTTAATGC	32	unmodifiziert
CACAATTTAAAGCCGAGGGTACAATCCA	28	unmodifiziert
CAGTATGTTAAGAACCGGGTACCGAGGAAGAACCC	35	unmodifiziert
TGTTACTAGGGAACACCCCGGATATTCA	28	unmodifiziert
CGGATTTTATAAAATGACGGGAGGCAAGAACAGATAGGACT	42	unmodifiziert
ACATCATTGAAGGGATTCACTAACAC	27	unmodifiziert
CGACACGAGGGTAGAAGCGCGTTTTAACTAAATTT	35	unmodifiziert
AACGCCACCAGCGAATTTGTATCATCGCGTGTACATCGATGA	42	unmodifiziert
GATTGTACATATGTGCAACTGAAAGCTGCTCATT	34	unmodifiziert
AATATTACATAACATGGATCCAAGTAAGACAATGA	35	unmodifiziert
TTGTTGTTCCCGTGAAAACAGTGAGTACCAGGCGGA	36	unmodifiziert
CCCGATATTAATCGGAACAAAGAAAACCATAAATGAGGAAG	42	unmodifiziert
ACTCCTGTAACTGTAATGCCAGGATTA	28	unmodifiziert
TTCAAATATCGCGTGGATTAGGTCATTTGCGGTGTCCAATTCT	42	unmodifiziert
TAATGTTTAGGAGCCAGACGACAACGGCTGTGAACAAGCTTG	42	unmodifiziert
GTAAAAAAGAGAAGACCAGGTCTTGAC	28	unmodifiziert
GGCCTTGCTGGTAAACACGACATAACCTACCTTTT	35	unmodifiziert

TACTAATTAACAGTGTGGAAGGGTTAGATAACGGA	35	unmodifiziert
AGCGGTTGAGCTCAGAGACCGGAACCGCCTCCCTCA	36	unmodifiziert
CTCCCGACAAGCCGGTCCACTGATGGCC	28	unmodifiziert
ACATATTGTGAATTCATTCAATAACATCTCAATTC	35	unmodifiziert
AAGATCGTCTTTCCTGTATCGTCACGACTTGGGTA	35	unmodifiziert
TCCTGAGATTAGTAGCTGATGTCAATAGTGAATTTGTAAATCCA-GATTC	49	unmodifiziert
GATTATAGCGGAATCTAACAACTAATCTCATCAAT	35	unmodifiziert
TTGTTAAGCCTGAGGAAACCTCCGGCTTAAGAATA	35	unmodifiziert
ATGCCGGGTAGGTAAGTAGTATTATACC	28	unmodifiziert
AAACTGCCTGGAACATAGGTGCCACCCT	28	unmodifiziert
CACTACGGGAAAGCCATGTTTCGAGAGG	28	unmodifiziert
TCCCCATTCTGCAACAAAACATGGCAACTATTACG	35	unmodifiziert
AGTCAGGTTACAGGAATTAAGTTAGCTA	28	unmodifiziert
CGGCGCTAACACGAAGTGCCATCCTTGGA	29	unmodifiziert
GACAGTCCAATATGTTGATAACCCAAAATAAATGTGAAC	39	unmodifiziert
CTGCGGCGTATTACGACCGAAGCCCTTTTAGCAA	35	unmodifiziert
AGAATAGAACCGCCAAGTTTTGTGGCGAATATCTG	35	unmodifiziert
ATTATGAACGCTGATAACTCATCTGGACTAAGGAT	35	unmodifiziert
AATCAAGCCCCGATGCGCCTGCAACGCC	28	unmodifiziert
CCCCCTTATTAGGAACCAGAGCCACCCACCACATGCTGATGTCTGA	47	unmodifiziert
GATAAAAGTAGCATCTCTGATTGCTTTGAAACAGT	35	unmodifiziert
ACCAGTCTATCCAGCACTTGACGGTACAGCGGGAGGCG	39	unmodifiziert
TGAAGCCACCGCACACTCCAACGTCATTTTAGTTGCAGCAAG	42	unmodifiziert
GAAGCAAGAGCTTATTTAAATTTAGTTTATTT	32	unmodifiziert
ACGCCAGGACGACAAAAAAGGTAAAGTACCAAGAA	35	unmodifiziert
AACGGGTCTAAAACTCAACATACAGGAA	28	unmodifiziert
TGATTAACCGAACAGAGTCACTGTTTCC	28	unmodifiziert
ATCAGGTTTAGAACCAAATCAATATATGGACTACC	35	unmodifiziert
CATTTCTTTGAAGTGTTTGCTTTCCACGCTGTTGA	35	unmodifiziert
TCAAGAGGTACTCACACCATCGAAGCGG	28	unmodifiziert
TCGCATCGCCAGGAATTAGTGAGATCGTCACAACCCATGTA	41	unmodifiziert
ACGTAGTCATACATGAAACATGAAGGTGACTCAAC	35	unmodifiziert
ATCACGAAGGTGTGTTTATACGGAAATAAAGGGC	34	unmodifiziert
CATTAATGGGCAACCTTACCAAGCGAAC	28	unmodifiziert
ACTGGGGTGTGAGTGTTAGTTGCTATTTTACAGAG	35	unmodifiziert
GACAGGACTGAGTAGTTATATTCATAGG	28	unmodifiziert
AAATAAAATGAATATTCATTTAATTACATTAATTAAGAA	39	unmodifiziert
TACGAGCGCAGAACTTAGAGCCGCGTAA	28	unmodifiziert
AGTAAATATTCCATCCTGAAATTATTCTTT	30	unmodifiziert
AGAACTCACAGCCAGGTGAGTATCTGTCGCTATCCAGAATTAATAAG	47	unmodifiziert
TTAACTCCAACAGGTCATTTAATTATCAAAA	31	unmodifiziert
AGACGATATTAAAGTACGGGGTGGGAAG	28	unmodifiziert



CAGCCTTTGCACCCTGGCCCTGAGAGGTATGCTTT	35	unmodifiziert
CCTGTAATTAGCAATAGAAAGTAGTAAG	28	unmodifiziert
TTACCGCACATTGGGTCGCTATTTAACA	28	unmodifiziert
GACGGAAGAACGAGGATATTGGAAAGAATTGATATGCAAGCC	42	unmodifiziert
AGTTAATTAGAAAACCTCACGCAGG	24	unmodifiziert
CCGTCTAAGAAAGGCCAGACGTAATAAG	28	unmodifiziert
TGTGTGAAGTGAGCTGAACACTTTTGTT	28	unmodifiziert
TGAACCAAACGACGAAGGAGCGAGGTGA	28	unmodifiziert
CGGGTTTATCAGCTGCATCGGGTATCGGCTGCCAG	35	unmodifiziert
GTTTTATGGAAACGAACCCACAAGAATTAAAGTCAT- GGGGTGCCAACGC	49	unmodifiziert
CCATATCACCAAGGATTCCCTGCCGTACTGGGGAA	35	unmodifiziert
CATCAATATATGATTATTCTAAAAATT	27	unmodifiziert
CGACCGTTGTAAATATAACATAACAATA	28	unmodifiziert
GAAATGACTGATACACGATACCAAAGACACTGGCA	35	unmodifiziert
CCACTCATTCCCAGGTATTAACCAAGTTTAAATC	35	unmodifiziert
TCTGGCCAACAGAAAAAATAAGTTACAATCGGGA	34	unmodifiziert
TGTGAAACCTCAGACAGCATTGACAGGAGCAGTCTGACATCA	42	unmodifiziert
TTCATGAAATACACCCTTCCTATATTTA	28	unmodifiziert
GTGCATTAATTCATAGCAGGAGAAATCCTCGCTCTGTATGTGCGA	45	unmodifiziert
ATTTTGCCTTTGCCACAATTCGACAACCTTGAGATTA	36	unmodifiziert
TTGACCGGCTTTCAGAAAGAGTGCTCCA	28	unmodifiziert
ACAGTACTGCACGTGCATCACATCAACAGTTG	32	unmodifiziert
ACATACATTGCTGATACCG	19	unmodifiziert
GCACTGCACTGGTGGGATGGGGAACCTAAGACTCC	35	unmodifiziert
TTAATGGAATACCACCGAACGAACCATAATGGACAT	36	unmodifiziert
AATTAAGCAAGTAGCCATAATGGGCTGGTGCCGCT	35	unmodifiziert
TCTTAAAGTATTAAGCCACCCACCTTTTCATGACG	35	unmodifiziert
CCGTTTCACGAACTTTCACGCCTGAGGGATAAAGT	35	unmodifiziert
AGAGGGACCAGCAGAGAGGTT- CGAAGTGCAAGTTAACTACAAACAGTT	48	unmodifiziert
GCCATTTGGGAATTAGAGCCATAAAGGTAATATTC	35	unmodifiziert
TTCATTCCCTTTTGTCACCAGAAGGACTTCTGAATAATAA	42	unmodifiziert
CATGAAGTTATGTAGATGAAGGTATAGA	28	unmodifiziert
TGTTGGGAAGTTCGCCAGATATATGTAA	28	unmodifiziert
CAACAACCTGAGGCCAGGCAACGGCGGA	28	unmodifiziert
GCGAACGAAAGAAGGACTGGATAGCGTCATGCTTTTGGC	39	unmodifiziert
AGATTAACAAAAATTCAGAAAATGTTTATTTGCCACATAACAATA	46	unmodifiziert
GAGCAATCCATGGTTTTACAAATAATTTAGAGCTAATATGTAG- ATTTT	49	unmodifiziert
GACATTCATAAAGGTATAGATGATTATTGAACAAA	35	unmodifiziert
ACCGTTCTGAGAAACTGACGAGAAGAAAAATC	32	unmodifiziert
ACGACGATACTATCATAACATTAACGTTGGGAAACACACG- TAACACCA	48	unmodifiziert

ATTCATGCAGAGGAAAACATGCGGTCAG-TATTAATCTAAAAAACAG	49	unmodifiziert
GTAAATAGGTTGGGAAGAACTCAAATTATAAAGGGATTTA	42	unmodifiziert
CGGTCCAAACGTGGTCATCGACTTTCCT	28	unmodifiziert
GGAAAAATCGTCTCTTAGAAAAGAAAA	28	unmodifiziert
TCTGAGATGAGTGACAGTAATAAAAGTTCACATC	35	unmodifiziert
GTCAATCATATAGCCGGCACCAACAAATACTCGG	35	unmodifiziert
CGAAATCTTGAAAGACTAGCATAAATTA	28	unmodifiziert
ATTCGTAATCATGGTGCGTTGGCATTAGAAAATAG	35	unmodifiziert
AGCCATATTAATTTGCCGGCGCAATCGGCAAAATC	36	unmodifiziert
ACTCGCGACCGCAAAAGGGAAGTTGAGTTAATGCG	35	unmodifiziert
CAGCAATTTATTATTCTCCAATTGATAC	28	unmodifiziert
GGGGATTCACTTCCAAGTTACGCCAAT	28	unmodifiziert
CGGCCTAATGAATTGTTATAAATGTATTTAGGTG-GAACGTGCAAAAT	49	unmodifiziert
TTTAACAAACAGTGAAAGCAAGTAGGG	28	unmodifiziert
AGAAGATAAAACAGAACCTCAATATCAATTGTTTG	35	unmodifiziert
AAAAGCGCCAGGCGATCACAGTTCTTCAGCAGGATCT	37	unmodifiziert
GACGCTGATTTTCCGAAATGGAGAATAC	28	unmodifiziert
ACGGTAAAACGTTATAATTCGTGTAGATGCCA	32	unmodifiziert
TCAATAGAAAAAATAAGTCGAGTACTCTGAACCTCGCTAC	39	unmodifiziert
ATGGTGGTTGAGTGTCATTACCCTAATT	28	unmodifiziert
AAGAACCCTTGAGATGCCTGAGCGGGAG	28	unmodifiziert
CCAGTCGGGAAACCCACCGCCAGCTACAGAGGTTT	35	unmodifiziert
AGCTTGAACGCGTCATCTTAGCCAATTTAATTTA	37	unmodifiziert
GCTATTAGACAATACGCTCACGCTCATAATT	31	unmodifiziert
AATTGTATCGTAAAAGGACAGCATTACC	28	ATTO 647 N
TATCATTATTCTGTAAGGGAAGAAAGACGGAAGGGCGAAAAA	42	5' -Biotin
ATTTCTTCACCCTCCACTCCAGGGCGCATCGTAACCGTGCATCCTC	46	5' -Biotin
GCTTTGATTGACCCTCAAAAAATATTTT	28	5' -Biotin
AGAATATTACTAGAAGGAGGCCGATTGAGCGGAAAGGAGCGG	42	5' -Biotin

### 7.3 Sequenzen der unmodifizierten und modifizierten Oligos des NRO

Sequenz	Länge (Basen)	Modifikation
CACAACAGGTGCCTAATGAGTGCCAGCAG	30	unmodifiziert
AAATTAAGTTGACCATTAGATACTTTTGCG	30	unmodifiziert
GTTTATCAATATGCGTTATACAAACCGACCGTGTGATAAA	40	unmodifiziert
GATGGCTTATCAAAAAGATTAAGAGCGTCC	30	unmodifiziert
AGCCACCACTGTAGCGCGTTTTCAAGGGAGGGAAGGTAAA	40	unmodifiziert
CATTTGAAGGCGAATTATTCATTTTGTGG	32	unmodifiziert

CTGAGCAAAAATTAATTACATTTTGGGTTA	30	unmodifiziert
TAAATGAATTTTCTGTATGGGATTAATTTCTT	32	unmodifiziert
CTCCAACGCAGTGAGACGGGCAACCAGCTGCA	32	unmodifiziert
ACGCTAACACCCACAAGAATTGAAAATAGC	30	unmodifiziert
AGGCTCCAGAGGCTTTGAGGACACGGGTAA	30	unmodifiziert
GCGCAGACAAGAGGCAAAAGAATCCCTCAG	30	unmodifiziert
GCCCGTATCCGGAATAGGTGTATCAGCCCAAT	32	unmodifiziert
GTACCGCAATTCTAAGAACGCGAGTATTATTT	32	unmodifiziert
GAAATTATTGCCTTTAGCGTCAGACCGGAACC	32	unmodifiziert
GACAAAAGGTAAAGTAATCGCCATATTTAACAAAACCTTT	40	unmodifiziert
TTATTACGAAGAACTGGCATGATTGCGAGAGG	32	unmodifiziert
GCCCGAGAGTCCACGCTGGTTTGCAGCTAACT	32	unmodifiziert
AACGCAAAATCGATGAACGGTACCGTTGA	30	unmodifiziert
GCCATCAAGCTCATTTTTTAACCACAAATCCA	32	unmodifiziert
GCAAGGCCTCACCAGTAGCACCATGGGCTTGA	32	unmodifiziert
GCGAGTAAAAATATTTAAATTGTTACAAAG	30	unmodifiziert
TCCACAGACAGCCCTCATAGTTAGCGTAACGA	32	unmodifiziert
TTAATGAACTAGAGGATCCCCGGGGGGTAACG	32	unmodifiziert
AGCCAGCAATTGAGGAAGGTTATCATCATTTT	32	unmodifiziert
CTTTAATGCGCGAACTGATAGCCCCACCAG	30	unmodifiziert
CTGTGTGATTGCGTTGCGCTCACTAGAGTTGC	32	unmodifiziert
ATCGCAAGTATGTAAATGCTGATGATAGGAAC	32	unmodifiziert
ATTACCTTTGAATAAGGCTTGCCCAAATCCGC	32	unmodifiziert
AACACCAAATTTCAACTTTAATCGTTTACC	30	unmodifiziert
ATAAGGGAACCGGATATTCATTACGTCAGGACGTTGGGAA	40	unmodifiziert
GCCTCCCTCAGAATGGAAAGCGCAGTAACAGT	32	unmodifiziert
GAGAGATAGAGCGTCTTTCCAGAGGTTTTGAA	32	unmodifiziert
TGTAGAAATCAAGATTAGTTGCTCTTACCA	30	unmodifiziert
CTCGTATTAGAAATTGCGTAGATACAGTAC	30	unmodifiziert
ATTATCATTCAATATAATCCTGACAATTAC	30	unmodifiziert
TACCGAGCTCGAATTCGGGAAACCTGTCGTGCAGCTGATT	40	unmodifiziert
GAGGGTAGGATTCAAAAGGGTGAGACATCCAA	32	unmodifiziert
ATATTCGGAACCATCGCCACGCAGAGAAGGA	32	unmodifiziert
GACCAACTAATGCCACTACGAAGGGGGTAGCA	32	unmodifiziert
ATTATACTAAGAAACCACCAGAAGTCAACAGT	32	unmodifiziert
AGAAAGGAACAATAAAGGAATCAAAAAA	31	unmodifiziert
TTGCTCCTTTCAAATATCGCGTTTGAGGGGGT	32	unmodifiziert
CCACCCTCTATTCAAAACAAATACCTGCCTA	32	unmodifiziert
AAGGCCGCTGATACCGATAGTTGCGACGTTAG	32	unmodifiziert
AGAAAACAAAGAAGATGATGAAACAGGCTGCG	32	unmodifiziert
CATGTAATAGAATATAAAGTACCAAGCCGT	30	unmodifiziert
TCATTAGATGCGATTTTAAGAACAGGCATAG	32	unmodifiziert
TAAATCATATAACCTGTTTAGCTAACCTTTAA	32	unmodifiziert

AGCAAGCGTAGGGTTGAGTGTTGTAGGGAGCC	32	unmodifiziert
GTCGACTTCGGCCAACGCGCGGGGTTTTTC	30	unmodifiziert
GCGAACCTCCAAGAACGGGTATGACAATAA	30	unmodifiziert
CAGCAAAAGGAAACGTCACCAATGAGCCGC	30	unmodifiziert
CTTTTGCAGATAAAAACCAAATAAAGACTCC	32	unmodifiziert
ATACATACCGAGGAAACGCAATAAGAAGCGCATTAGACGG	40	unmodifiziert
TTAACACCAGCACTAACAATAATCGTTATTA	32	unmodifiziert
GCGGAACATCTGAATAATGGAAGGTACAAAAT	32	unmodifiziert
TATAACTAACAAAGAACGCGAGAACGCCAA	30	unmodifiziert
AACAAGAGGGATAAAAAATTTTAGCATAAAGC	32	unmodifiziert
ACCCTTCTGACCTGAAAGCGTAAGACGCTGAG	32	unmodifiziert
AAGGAAACATAAAGGTGGCAACATTATCACCG	32	unmodifiziert
TCAAATATAACCTCCGGCTTAGGTAACAATTT	32	unmodifiziert
TAAGAGCAAATGTTTAGACTGGATAGGAAGCC	32	unmodifiziert
TTATACCACCAAATCAACGTAACGAACGAG	30	unmodifiziert
ATACCCAACAGTATGTTAGCAAATTAGAGC	30	unmodifiziert
AAAGTCACAAAATAAACAGCCAGCGTTTTA	30	unmodifiziert
TGAAAGGAGCAAATGAAAAATCTAGAGATAGA	32	unmodifiziert
TGCATCTTTCCAGTCACGACGGCCTGCAG	30	unmodifiziert
CACATTAAAATTGTTATCCGCTCATGCGGGCC	32	unmodifiziert
ACCGATTGTCGGCATTTTCGGTCATAATCA	30	unmodifiziert
CGTAAACAGAAATAAAAAATCCTTTGCCCGAAAGATTAGA	40	unmodifiziert
CCAACAGGAGCGAACCAGACCGGAGCCTTTAC	32	unmodifiziert
TCAAGTTTCATTAAAGGTGAATATAAAAGA	30	unmodifiziert
CTGTAGCTTGACTATTATAGTCAGTTCATTGA	32	unmodifiziert
TCACCAGTACAACTACAACGCCTAGTACCAG	32	unmodifiziert
TTTTCACTCAAAGGGCGAAAAACCATCACC	30	unmodifiziert
CCCGATTAGAGCTTGACGGGGAAAAAGAATA	32	unmodifiziert
ATTTTAAATCAAAATTATTTGCACGGATTCTG	32	unmodifiziert
TAAAAGGGACATTCTGGCCAACAAAGCATC	30	unmodifiziert
TTTTATTTAAGCAAATCAGATATTTTTGT	30	unmodifiziert
TTAGGATTGGCTGAGACTCCTCAATAACCGAT	32	unmodifiziert
AAAGCACTAAATCGGAACCTAATCCAGTT	30	unmodifiziert
TATTAAGAAGCGGGGTTTTGCTCGTAGCAT	30	unmodifiziert
CTTTTACAAAATCGTCGCTATTAGCGATAG	30	unmodifiziert
ACAACTTTCAACAGTTTCAGCGGATGTATCGG	32	unmodifiziert
AATACTGCCAAAAGGAATTACGTGGCTCA	30	unmodifiziert
TCAATATCGAACCTCAAATATCAATTCCGAAA	32	unmodifiziert
TAATCAGCGGATTGACCGTAATCGTAACCG	30	unmodifiziert
TAGGTAACTATTTTTGAGAGATCAAACGTTA	32	unmodifiziert
AGGAACCCATGTACCGTAACACTTGATATAA	31	unmodifiziert
CCAGGGTTGCCAGTTTGAGGGGACCCGTGGGA	32	unmodifiziert
CGCGCAGATTACCTTTTTTAATGGGAGAGACT	32	unmodifiziert

TTTATCAGGACAGCATCGGAACGACACCAACCTAAAACGA	40	unmodifiziert
CTTATCATTCCCGACTTGCGGGAGCCTAATTT	32	unmodifiziert
ACCTTTTTATTTTAGTTAATTTTCATAGGGCTT	32	unmodifiziert
ATGCAGATACATAACGGGAATCGTCATAAAATAAGCAAAG	40	unmodifiziert
TTAGTATCACAATAGATAAGTCCACGAGCA	30	unmodifiziert
TAAATCAAAATAATTCGCGTCTCGGAAACC	30	unmodifiziert
CAACCGTTTCAAAATCACCATCAATTCGAGCCA	32	unmodifiziert
GAGAAGAGATAACCTTGCTTCTGTTGCGGAGAAACAATAA	40	unmodifiziert
TGGAACAACCGCCTGGCCCTGAGGCCCGCT	30	unmodifiziert
CTACCATAGTTTGAGTAACATTTAAAATAT	30	unmodifiziert
GCCTTAAACCAATCAATAATCGGCACGCGCCT	32	unmodifiziert
GCGGATAACCTATTATTCTGAAACAGACGATT	32	unmodifiziert
CGGATTCTGACGACAGTATCGGCCGCAAGGCGATTAAGTT	40	unmodifiziert
GTATAGCAAACAGTTAATGCCCAATCCTCA	30	unmodifiziert
GATGTGCTTCAGGAAGATCGCACAAATGTGA	30	unmodifiziert
CGGATTGCAGAGCTTAATTGCTGAAACGAGTA	32	unmodifiziert
AATAGTAAACACTATCATAACCCCTCATTGTGA	32	unmodifiziert
GACCTGCTCTTTGACCCCCAGCGAGGGAGTTA	32	unmodifiziert
AGACGACAAAGAAGTTTTGCCATAATTCGAGCTTCAA	37	unmodifiziert
CTTTAGGGCCTGCAACAGTGCCAATACGTG	30	unmodifiziert
ATCCCCCTATACCACATTCAACTAGAAAAATC	32	unmodifiziert
GAATTTATTTAATGGTTTGAAATATTCTTACC	32	unmodifiziert
GCTTTCCGATTACGCCAGCTGGCGGCTGTTTC	32	unmodifiziert
GTTTTAACTTAGTACCGCCACCCAGAGCCA	30	unmodifiziert
AATGGTCAACAGGCAAGGCAAAGAGTAATGTG	32	unmodifiziert
CTTAGATTTAAGGCGTTAAATAAAGCCTGT	30	unmodifiziert
ACACTCATCCATGTTACTTAGCCGAAAGCTGC	32	unmodifiziert
TTAACGTCTAACATAAAAAACAGGTAACGGA	30	unmodifiziert
TGTAGCCATTAATAATTCGCATTAAATGCCGGA	32	unmodifiziert
TTTCGGAAGTGCCGTCGAGAGGGTGAGTTTCG	32	unmodifiziert
AATTGAGAATTCTGTCCAGACGACTAAACCAA	32	unmodifiziert
AGGCAAAGGGAAGGGCGATCGGCAATTCCA	30	unmodifiziert
CCACCCTCATTTTCAGGGATAGCAACCGTACT	32	unmodifiziert
GCGAAAAATCCCTTATAAATCAAGCCGGCG	30	unmodifiziert
AAAGGCCGGAGACAGCTAGCTGATAAATTAATTTTGT	38	unmodifiziert
AATACGTTTGAAAGAGGACAGACTGACCTT	30	unmodifiziert
AGCGCGATGATAAATTGTGTCGTGACGAGA	30	unmodifiziert
TTCCAGTCGTAATCATGGTCATAAAAGGGG	30	unmodifiziert
GATGGTTTGAACGAGTAGTAAATTTACCATTA	32	unmodifiziert
AAACAGCTTTTTGCGGGATCGTCAACACTAAA	32	unmodifiziert
TTGACAGGCCACCACCAGAGCCGCGATTGTGA	32	unmodifiziert
TCTAAAGTTTTGTCGTCTTTCCAGCCGACAA	31	unmodifiziert
CAAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAAACGTGGA	31	unmodifiziert

TCGGCAAATCCTGTTTGATGGTGGACCTCAA	32	unmodifiziert
TTCTACTACGCGAGCTGAAAAGGTTACGCGC	32	unmodifiziert
CGATAGCATTGAGCCATTTGGGAACGTAGAAA	32	unmodifiziert
TACGTTAAAGTAATCTTGACAAGAACCGAACT	32	unmodifiziert
CGAAAGACTTTGATAAGAGGTCATATTCGCA	32	unmodifiziert
TCATCGCCAACAAAGTACAACGGACGCCAGCA	32	unmodifiziert
AACAGTTTTGTACCAAAAACATTTTATTTTC	30	unmodifiziert
TGACAACTCGCTGAGGCTTGATTATACCA	30	unmodifiziert
TTTAGGACAAATGCTTTAAACAATCAGGTC	30	unmodifiziert
CCTAAATCAAAATCATAGGTCTAAACAGTA	30	unmodifiziert
GCTATCAGAAATGCAATGCCTGAATTAGCA	30	unmodifiziert
GATTTAGTCAATAAAGCCTCAGAGAACCCTCA	32	unmodifiziert
ACAACATGCCAACGCTCAACAGTCTTCTGA	30	unmodifiziert
AGTATAAAGTTCAGCTAATGCAGATGTCTTTC	32	unmodifiziert
CCTGATTGCAATATATGTGAGTGATCAATAGT	32	unmodifiziert
GCCAGTTAGAGGGTAATTGAGCGCTTTAAGAA	32	unmodifiziert
TCTTCGCTGCACCGCTTCTGGTGCGGCCTTCC	32	unmodifiziert
GTAATAAGTTAGGCAGAGGCATTTATGATATT	32	unmodifiziert
TCACCGACGCACCGTAATCAGTAGCAGAACCG	32	unmodifiziert
ATATTTTGGCTTTCATCAACATTATCCAGCCA	32	unmodifiziert
AACGCAAAGATAGCCGAACAAACCCTGAAC	30	unmodifiziert
TATATTTTGTCAATTGCCTGAGAGTGGAAGATTGTATAAGC	40	unmodifiziert
GGCCTTGAAGAGCCACCACCCTCAGAAACCAT	32	unmodifiziert
CAACTGTTGCGCCATTGCGCCATTCAAACATCA	32	unmodifiziert
ATCCCAATGAGAATTAAGTGAACAGTTACCAG	32	unmodifiziert
GCCGTCAAAAAACAGAGGTGAGGCCTATTAGT	32	unmodifiziert
CATCAAGTAAAACGAACCTAACGAGTTGAGA	30	unmodifiziert
AAGTAAGCAGACACCACGGAATAATATTGACG	32	unmodifiziert
TTAAAGCCAGAGCCGCCACCCTCGACAGAA	30	unmodifiziert
GCCCTTCAGAGTCCACTATTAAGGGTGCCGT	32	unmodifiziert
CACCAGAAAGGTTGAGGCAGGTCATGAAAG	30	unmodifiziert
CATAAATCTTTGAATACCAAGTGTTAGAAC	30	unmodifiziert
AACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAACAGTAA	31	unmodifiziert
CAGGAGGTGGGGTCAGTGCCTTGAGTCTCTGAATTTACCG	40	unmodifiziert
CAGCGAAACTTGCTTTCGAGGTGTTGCTAA	30	unmodifiziert
GTTTATTTTGTCACAATCTTACCGAAGCCCTTAATATCA	40	unmodifiziert
AATAGCTATCAATAGAAAATTCAACATTCA	30	unmodifiziert
TTTACCCCAACATGTTTTAAATTTCCATAT	30	unmodifiziert
GCAATTCACATATTCCTGATTATCAAAGTGTA	32	unmodifiziert
AAATCACCTTCCAGTAAGCGTCAGTAATAA	30	unmodifiziert
AAGCCTGGTACGAGCCGGAAGCATAGATGATG	32	unmodifiziert
ACGGCTACAAAAGGAGCCTTTAATGTGAGAAT	32	unmodifiziert
GCACAGACAATATTTTTGAATGGGGTCAGTA	31	unmodifiziert

ACAAACGGAAAAGCCCCAAAAACACTGGAGCA	32	unmodifiziert
AGAGAGAAAAAATGAAAATAGCAAGCAAAC	32	unmodifiziert
ACCTTGCTTGGTCAGTTGGCAAAGAGCGGA	30	unmodifiziert
TAAATCGGGATTCCCAATTCTGCGATATAATG	32	unmodifiziert
CAGAAGATTAGATAATACATTTGTCGACAA	30	unmodifiziert
CCAATAGCTCATCGTAGGAATCATGGCATCAA	32	ATTO 647 N
TAGAGAGTTATTTTCATTTGGGGATAGTAGCATT	38	5'-Biotin
GAAACGATAGAAGGCTTATCCGGTCTCATCGAGAACAAGC	40	5' -Biotin

#### 7.4 Sequenzen der DNA-Origami-Nanoantenne

Sequenz	Länge (Basen)	Modifikation
TTAGTTTGAGTGCCCGAGAAATAAAGAAATTGCGTAGAGATA	42	unmodifiziert
TATGACTTTATACATTTTTTTTAATGGAAACAGTACACCGT	42	unmodifiziert
AATAAAACGAACTATGACCCACCAAGC	28	unmodifiziert
CTCATCGGGATTGAGTGAGCGAGTAACAACCCGTC	35	unmodifiziert
CCCAGCTACAATGACAGCATTTGAGGCAAGTTGAGAAATGAA	42	unmodifiziert
TCATACATTTAATACCGATAGCCCTAAACATCGAACGTAAC	42	unmodifiziert
ACGCGGTCCGTTTTTGGGTAAGTGA	25	unmodifiziert
CTTACGGAACAGTCAGGACGTTGGGAAGAAA	31	unmodifiziert
GGAACCATACAGGCAAGGCAAATCAAAAAGACGTAGTAGCAT	42	unmodifiziert
CTAAATCGGTCAGAATTAGCAAAATTAAGCAATAAAATAATA	42	unmodifiziert
TTTAGCGATACCAACGCGTTA	21	unmodifiziert
AAGAAAGCTTGATACCGCCACGCATACAGACCAGGCGCTGAC	42	unmodifiziert
CCCCGCTAGGGCAACAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTTATT	42	unmodifiziert
GCCCGAGTACGAGCCGGAAGC	21	unmodifiziert
CATTTGCAAAATGTCATCTGCGAACGAGAGATTACAATGCC	42	unmodifiziert
TATTTAAATTGCAGGAAGATTG	22	unmodifiziert
AAAGATTACAGAACGGGAGAAGGAAACGTCACCAAT-GAAACCA	43	unmodifiziert
ACGTAAGAATTCGTTCTTAGAAGAACTCAAACATATCGGATAA	42	unmodifiziert
GCGAATCAGTGAGGCCACCGAGTAGTAGCAACTGAGAGTTGA	42	unmodifiziert
TCGTGCCGGAGTCAATAGTGAATTTGCAGAT	31	unmodifiziert
TAGCCTCAGAGCATACCCTGT	21	unmodifiziert

AGCAACAAAGTCAGAAATAATATCCAATAATCGGCTCAGGGA	42	unmodifiziert
AGGCTTGCGAGACTCCTCAAGAGAAAAGTATTCGGAAC	38	unmodifiziert
ACCTGACGGGGAAAGCCGGCGAACCAAGTGTCTGCGCGTTGC	42	unmodifiziert
CCGTAATCAGTAGCGACAGAATCTAATTATTCATTA AAAAGG	42	unmodifiziert
GAACTGGCTCATTACAAC TTTAATCATTCTTGAGATTACTTA	42	unmodifiziert
GAGTTAAAAGGGTAATTGAGCGCTAATATCAGAGGAACT- GAACACC	46	unmodifiziert
AGTTTCCAACATTATTACATTATAC	25	unmodifiziert
ACGCGAGAGAAGGCCATGTAATTTAGGCCAGGCTTAATT- GAGAATCGC	48	unmodifiziert
ACTAATGCCACTACGAATAAA	21	unmodifiziert
CTGTATGGGATTACCGTTAGTATCA	25	unmodifiziert
TAGCCAGCTTTTCATCCAAAAATAAACGT	28	unmodifiziert
CCTCGTTTACCAGAAACCAA	21	unmodifiziert
TTAGCCCTGACGAGAAACACCAGAAATTGGGGTGAATTATTT- TAA	45	unmodifiziert
TGAGTAAAGGATAAGTTTAGCTATATCATAGACCATTAGATA	42	unmodifiziert
ATTTCTGATTATCAGATGATGGCTTTAAAAAGACGCTAAAA	42	unmodifiziert
CCAGCCTCCGATCCTCATGCCGGA	24	unmodifiziert
ATGAAGGGTAAAGTTCACGGTGCGGCCATGCCGGTCGCCATG	42	unmodifiziert
TAAGTTGGCATGATTAAAGAA	21	unmodifiziert
TAATATCAAAGGCACCGCTTCTGGCACT	28	unmodifiziert
GTCGCAGAAAACTTAAATTTGCC	24	unmodifiziert
GTAAAGGAAAGACAGCATCTGCCTATTTAAGAGGCAG- GAGGTTTA	46	unmodifiziert
AAGGCTCCAAAAGGAGCCTTTATATTTTTTACGTGCTACAGT- CACCT	49	unmodifiziert
TAACGACATTTTTACCAGCGCCAAAGAAAGTTACCAGAAC- CCAAA	45	unmodifiziert
AAGGGATATTCATTACCGTAATCTATAGGCT	31	unmodifiziert
TTCGGTCCCATCGCATAGTTGCGCCGACATGCTTTCGAGGTG	42	unmodifiziert
AATATCGTTAAGAGAGCAAAGCGGATTGTGAAAAATCA- GGTCTTT	45	unmodifiziert



AAATGACGCTAAATGGATTATTTACATTGGCGAATACCTGGA	42	unmodifiziert
ACCGCCACCCTCAGAACCCGTACTCTAGGGA	31	unmodifiziert
TTCGGGGTTTCTGCCAGGCCTGTGACGATCC	31	unmodifiziert
AGTACCGCATTCCACAACATGTTGAGCCTTAAGGTAAAG-TAATTC	45	unmodifiziert
CCCGGTTGATAAAGCATGTCAATC	24	unmodifiziert
AGTAGGTATATGCGTTATACA	21	unmodifiziert
CTGGCATTAGGAGAATAAAATGAAGAAACGATTTTTTGAGTA	42	unmodifiziert
CGAACACCAAATAAAATAGCAGCCAAGTTTGCCTTTAGCGT-CAGA	45	unmodifiziert
TGCTAAATCGGGGAGCCCCGATTTAGAGCTAGCAGAACATT	42	unmodifiziert
CGCGCTACAGAGTAATAAAAGGGACATTCTGATAGAAGTTAG	42	unmodifiziert
AAGACAAATCAGCTGCTCATTGAGTCTGACCA	32	unmodifiziert
TTTTCCAGCATCAGCGGGGCTAAAGAACCTCGTAGCACGCCA	42	unmodifiziert
ACATAAGTAGAAAAATCAAGAAGCAAAAGAAGATGTCAT	39	unmodifiziert
CAAAATCACCGGAACCAGAGCCAGATTTTGTACAAATCACAC	42	unmodifiziert
GCTGTAGTTAGAGCTTAATTG	21	unmodifiziert
TTATAAGGGTATGGAATAATTCATCAATATA	31	unmodifiziert
ATAGCGAGAGGCTATCATAACCAAATCCCAAAGAAAATTTCA-TCCTCAT	49	unmodifiziert
GCGAAACAAAGTGTAACACATGGCCTCGATTGAACCA	39	unmodifiziert
TTTAGATTACACAGTCACACGACCGGCGCGTGCTTTCCAGA	42	unmodifiziert
CAAGCCCAATAGGAACCACCTCACCCGGAA	31	unmodifiziert
AGCTCTTACCGAAGCCCAATA	21	unmodifiziert
CATTTGAGATAACCCACGAAACAATG	26	unmodifiziert
AATACCCCAACATTCATCAAAAAATAATTCGCGTCT	35	unmodifiziert
ACGAGCGGCGCGGTCAGGCAAGGCGATTAAGTTGGG-TAAAC	42	unmodifiziert
TAAACCGTTAAAGAGTCTGTCCATCCAGAAACCACACAATC	42	unmodifiziert
TATTACGAATAATAACAAATCAGATATGCGT	32	unmodifiziert
GAAGGAGCGGAATTATCATCATATATCATTTACATAGCACAA	42	unmodifiziert
CCTCGTCTTTCCACCACCGGAACCGCCTCCCTCA	34	unmodifiziert

AACAAGAGCCTAATGCAGAACGCGC	25	unmodifiziert
AGAAATCGTTAGACTACCTTTTTAAGGCGTTCTGACCTTTTT- GCA	45	unmodifiziert
AGTTTATTGTCCATATAACAGTTGATTC	28	unmodifiziert
ATTTGGAAGTTTCATGCCTCAACATGTTTTA	31	unmodifiziert
GAGAACAAATATACAAAATCGCGCAGAGGCGATT- CGACAAATCCTTTAAC	49	unmodifiziert
GTCGCGTGCCTTCGAATTGTCAAAG	25	unmodifiziert
GAACCGCCACCCTCCATATCATACC	25	unmodifiziert
CGCGCCGCCACCAGAACAGAGCCATAAAGGTGGAA	35	unmodifiziert
CAAAGCACTAGATAGCTCCATTCAGGCTGCGCAACTGTCTTG	42	unmodifiziert
GGCCAACGCGCGGGGAGGGCCCTGTGTTTGA	31	unmodifiziert
GAGGCCAAGCTTTGAATACCAAGTACGGATTACCTTTTCAA	42	unmodifiziert
GGCGAAGCACCGTAATAACGCCAGGGTTTTCCAGTCATGGG	42	unmodifiziert
TGAAAATCCGGTCAATAACCTAAATTTTAGCCTTT	35	unmodifiziert
TATTGAAAGGAATTGAGGTAG	21	unmodifiziert
GAGCATTTATCCTGAATCAAACGTGACTCCT	31	unmodifiziert
ATCGGTCAGATGATATTCACAAACCAAAGA	31	unmodifiziert
GTAAAACGACGGCCCATCACCCAAATCAGCGC	32	unmodifiziert
GGCGCAGACGGTCAATCATCGAGACCTGCTCCATGTGGT	39	unmodifiziert
TTTTTGCGGATGCTCCTAAATGTTTAGATGAATTTT- GCAAAAGAAGTT	49	unmodifiziert
AAGGCCTGTTTAGTATCATGTTAGCTACCTC	31	unmodifiziert
CGAGGGTACTTTTTCATGAACGGGGTCATAATGCCGAGCCAC- CACC	46	unmodifiziert
AGCTTTCAGAGGTGGCGATGGCCAGCGGGAAT	32	unmodifiziert
TTGGTAGAACATTTAATTAAGCAAC	25	unmodifiziert
ACCAGACCGGATTAATTCGAGC	22	unmodifiziert
GGCAACACCAGGGTCTAATGAGTGAGCTCACAACAATAGGGT	42	unmodifiziert
ATCGATGCTGAGAGTCTACAAGGAGAGG- GAACGCCAAAAGGA	42	unmodifiziert
ACCAACAAACCAAATTAACAATTTCAATTTGAATTACCGAGG	42	unmodifiziert

GCGAAAATCCCGTAAAAAAGCCGTGGTGCTCATAC- CGGCGTCCG	45	unmodifiziert
GAATTCGTCTCGTCGCTGGGTCTGCAATCCATTGCAACACGG	42	unmodifiziert
AATATGCAACTACCATCATAGACCGGAACCGC	32	unmodifiziert
CCTGCGCTGGGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAG- GAGCGGGGCCG	42	unmodifiziert
CAAATTATTCATTTCAATTACCTGAGTA	28	unmodifiziert
AATTGTGTCGAAATCCGCGGCACACAACGGAGATTTGTATCA	42	unmodifiziert
TGCGTGTTCAAGTTGTGTACATCG	24	unmodifiziert
AACCGTGTCATTGCAACGGTAATATATTTTAAATGAAAGGGT	42	unmodifiziert
TGGCTTTTTACCGTAGAATGGAAAGCG	27	unmodifiziert
CGTACAGGCCCCCTAACCGTCCCCGGGTACCGAGCGTTC	39	unmodifiziert
AAGAAAGCGCTGAACCTCAAATATTCTAAAGGAAAGCGTTCA	42	unmodifiziert
TTCATCGGCATTTTCGGTCATATCAAAA	28	unmodifiziert
CCTAATTTAACAAACCTCAATCAATATCTGATTGCTAATC	42	unmodifiziert
AAACTCACAGGAACGGTACGCCAGTAAAGGGGGTGAG- GAACC	42	unmodifiziert
AATTTCTTAAACCCGCTTAATTGTATCGTTGCGGGCGATATA	42	unmodifiziert
GAGAAGGCATCTGCAATGGGATAGGTCAAAAC	32	unmodifiziert
CCAATGTTTAAGTACGGTGTCCAAC	25	unmodifiziert
AAATCAGCTCATTTTTTAACCATTTTGTAAAATTCGCATTA	42	unmodifiziert
TTTACCAGTCCCGGCCTGCAGCCCACTACGGGCGCACCAGCT	42	unmodifiziert
CTGAATATAGAACCAAATTATTTGCACGTAAAACAACGT	39	unmodifiziert
GTAATTAATTTAGAATCTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGCAAA	42	unmodifiziert
TAAAGCCTCCAGTACCTCATAGTTAGCG	28	unmodifiziert
AGGGAGCCGCCACGGGAACGGATAGGCGAAAGCATCA- GCACTCTG	45	unmodifiziert
TTGGGCGGCTGATTTCCGGCAAAATCCCT	28	unmodifiziert
CCGACTTGTTGCTAAAATTTATTTAGTTCGCGAGAGTCGTCTT- TCCAGA	49	unmodifiziert
CCATAATGCCAGGCTATCAAGGCCGGAGACATCTA	35	unmodifiziert
TGACCGCGCCTTAATTTACAATATTTTGAATGGCTATCACA	42	unmodifiziert

ACTAAAGAGCAACGTGAAAATCTCCACCCACAACCTAAAGGAA	42	unmodifiziert
AGACAGCAGAAACGAAAGAGGAAATAAATCGAGGT- GACAGTTAAAT	46	unmodifiziert
TTTCCATGGCACCAACCTACGTCATACA	28	unmodifiziert
TTGCGAATAATATTTACAGCGGAGTGAGGTAAAATTTGAGG	42	unmodifiziert
ATAAAGTCTTTCCTTATCACT	21	unmodifiziert
AGGACAGATGAACGGTGTAACATAAGGGAACCGAAGAAT	39	unmodifiziert
CAAGCCGCCCAATAGCAAGTAAACAGCCATATTATTTT- GCCATAAC	46	unmodifiziert
AACAACAGGAAGCACGTCCTTGCTGGTAATATCCAGAAACGC	42	unmodifiziert
ACAACGCCTGTAGCATTTACCGTATAGGAAG	31	unmodifiziert
CCGTGTGATAAATAACCTCCGGCTGATG	28	unmodifiziert
AGAATTTTAGAGGAAAACAATATTACCGCCAGCTGCTCATTT	42	unmodifiziert
AGAACTTAGCCTAATTATCCCAAGCCCCCTTATTAGCGTTT- GCCA	45	unmodifiziert
CATCGAGATAACGTCAAACATAAAAGAGCAAAAGAATT	38	unmodifiziert
TTACCATTAGCAAGGCCTTGAATTAGAGCCAGCCGACTT- GAGC	44	unmodifiziert
GACAATTACGCAGAGGCATTTTCGAG	26	unmodifiziert
AATATTCATTGAATCCATGCTGGATAGCGTCCAAT	35	unmodifiziert
TTAACTCGGAATTAGAGTAAATCAATATATGTGAGTGATTCT	42	unmodifiziert
CGTGTCAAATCACCATCTAGGTAATAGATTT	31	unmodifiziert
TATCAGCAACCGCAAGAATGCCAATGAGCCTGAGGATCTATC	42	unmodifiziert
GGGATATTGACGTAGCAATAGCTAAGATAGC	31	unmodifiziert
TAAGTTTACACTGAGTTTCGT	21	unmodifiziert
GCTGGCATAGCCACATTATTC	21	unmodifiziert
CGTACTATGGTAACCACTAGTCTTTAATGCGCGAACTGAATC	42	unmodifiziert
ACGGGCCGATAATCCTGAGAAGTGTTTTATGGAGCTAACCG	42	unmodifiziert
CAAACGGAATAGGAAACCGAGGAATAAGAAATTACAAG	38	unmodifiziert
TCACAGCGTACTCCGTGGTGAAGGGATAGCTAAGAGACGAGG	42	unmodifiziert
TAACATCCAATAAATGCAAAGGTGGCATCAACATTATGAAAG	42	unmodifiziert
CAGCAGCGCCGCTTGTTTATCAGCTTCACGAAAAA	35	unmodifiziert

TAGCCCGGAATAGGTGTAAGGATAAGTGCCGTCGA	35	unmodifiziert
AAATGCGGAAACATCGGTTTTCAGGTTTAACGTCAGATTAAC	42	unmodifiziert
ATTTCAACCAAAAATTCTACTAATAGTTAGTTTCATTT- GGGGCGCGAGC	49	unmodifiziert
TGCTGATTGCCGTTGTCATAAACATCGGGCGG	32	unmodifiziert
GGCTAAACTTCAGAAAAGTTTTGCGGGAGATAGAACC	38	unmodifiziert
GAGTCTGGATTTGTTATAATTACTACATACACCAC	35	unmodifiziert
ATTGTTATCTGAGAAGAAACCAGGCAAAGCGCCATTCGTAGA	42	unmodifiziert
CGGAATAGAAAGGAATGCCTTGCTAAACAACTTTCAAC	38	unmodifiziert
CTAGTCAGTTGGCAAATCAACAGTCTTTAGGTAGATAACAAA	42	unmodifiziert
AGTCGCCTGATACTTGTCATAACAGAATACGTGGCACAGCTGA	42	unmodifiziert
CACGGCAACAATCCTGATATACTT	24	unmodifiziert
CCTCATCACCCAGCAGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGTGCC	42	unmodifiziert
TGAGCAAATTTATACAGGAATAACATCACTTGCTGAGTCTT	42	unmodifiziert
AATAGAAAAAATAAACGTCTGAGAGGAATA- TAAGAGCAACACTATGAT	49	unmodifiziert
ATTACGAGATAAATGCCAGCTTTGAGGGGACGACGACAG	39	unmodifiziert
GCTGGTCTGGTCAGGAGCCGGAATCCGCCGTGAACAGTGCCA	42	unmodifiziert
CTTGTAGAACGTCAGCGGCTGATTGCAGAGTTTTTCGACGTT	42	unmodifiziert
ACATAAAGCCCTTACACTGGTCGGGTAAATTTGT	35	unmodifiziert
TGCCATCCCACGCAGGCAGTTCCTCATTGCCGTTTTAAACGA	42	unmodifiziert
GCCAGCAGTTGGGCGCAAATCAGGTTTCTTGCCCTGCGTGGT	42	unmodifiziert
TACGGCTGGAGGTGCGCACTCGTCACTGTTTGCTCCCGGCAA	42	unmodifiziert
GAGAGATAGACTTTACGGCATCAGA	25	unmodifiziert
ATTAGCGGGGTTTTGCTCAGTACCAGGCTGACAACAAGCTG	41	5'-Biotin
TGCCCGTATAAACAGTGTGCCTTCTGGTAA	30	5'-Biotin
AGAAAACGAGAATGACCATAAATCTACGCCCTCAAAT- GCTTTA	44	5'-Biotin
ATAACTATATGTAAATGCTTAGGATATAAT	30	5'-Biotin
AGGAATCATTACCGCGTTTTTATAAGTACC	30	5'-Biotin
GATTAGAGAGTACCTTAACTCCAACAGG	28	5'-Biotin
CCTTAAATCAAGATTAGCGGGAGGCTCAAC	30	5'-Biotin

GCATGTAGAAACCAATCCATCCTAGTCCTG	30	5'-Biotin
AGAGAAAATCCAGAGAGTTGCAGCAAATC	29	3'-Atto647N
TGGTGGTTGTTCCAGTTTGAACAAAAAAAAAAAAAAAA	39	NP-Poly A links
GGATGTGGTTTGCCCCAGCAGAAAAAAAAAAAAAAAA	36	NP-Poly A links
CGCTTTCAGTTAGCTGTTTAAAGAACG- TAAAAAAAAAAAAAAAA	44	NP-Poly A links

### Sequenzen der Nanoantenne für das niedrig FRET-Monomer

Sequenz	Länge (Basen)	Modifikation
TGAGTGTTCCGAAAGCCCTTCACCGCCTAGGC	32	3'-Cy3B
GGTATTAATTGCGTTGCTGTT	21	unmodifiziert
ATCCGCTCACAATTCCAACTCACTTGCGTA	31	unmodifiziert
TGCATTAATGAGCGGTCCACGCTCA- CTGCGCCACGTGCCAGC	42	unmodifiziert
AGCGCAGCTCCAACCGTAATCATGGTCACGGGAAACCT	38	unmodifiziert
GCGTCCACTATTCCTGTGTGAAATGCTCACTGCC	34	unmodifiziert

### Sequenzen der Nanoantenne für das niedrig FRET-Dimer

Sequenz	Länge	Modifikation
TGAGTGTTCCGAAAGCCCTTCACCGCCTAGGC	32	3'-Cy3B
GGTATTAATTGCGTTGCTGTT	21	unmodifiziert
ATCCGCTCACAATTCCAACTCACTTGCGTA	31	unmodifiziert
TGCATTAATGAGCGGTCCACGCTCA- CTGCGCCACGTGCCAGCAAAAAAAAAAAAAAAAA	57	NP-Poly A rechts
AGCGCAGCTCCAACCGTAATCATGGTCACGGGAAAC- CTAAAAAAAAAAAAAAAA	53	NP-Poly A rechts
GCGTCCACTATTCCTGTGTGAAATGCTCA- CTGCCAAAAAAAAAAAAAAAA	49	NP-Poly A rechts

### Sequenzen der Nanoantenne für das hoch FRET-Monomer

Sequenz	Länge	Modifikation
TGCA-Atto532-ATTAATGAGCGGTCCACGCTCA- CTGCGCCACGTGCCAGC	43	intern markierter Atto532

TGAGTGTTCGAAAGCCCTTCACCGCCTAGGCGGTATTA	39	unmodifiziert
ATTGCGTTGCTGTTATCCGCTCACAATTCCAACTCACTTGCGTA	45	unmodifiziert
TGCATTAATGAGCGGTCCACGCTCACTGCGCCACGTGCCAGC	42	unmodifiziert
AGCGCAGCTCCAACCGTAATCATGGTCACGGGAAACCT	38	unmodifiziert
GCGTCCACTATTCCTGTGTGAAATGCTCACTGCC	34	unmodifiziert

### Sequenzen der Nanoantenne für das hoch FRET-Dimer

Sequenz	Länge	Modifikation
TGCA-Atto532-ATTAATGAGCGGTCCACGCTCA- CTGCGCCACGTGCCAGC	43	intern markierter Atto532
TGAGTGTTCGAAAGCCCTTCACCGCCTAGGCGGTATTA	39	unmodifiziert
ATTGCGTTGCTGTTATCCGCTCACAATTCCAACTCACTTGCGTA	45	unmodifiziert
TGCATTAATGAGCGGTCCACGCTCA- CTGCGCCACGTGCCAGCAAAAAAAAAAAAAA	57	NP-Poly A rechts
AGCGCAGCTCCAACCGTAATCATGGTCACGGGAAAC- CTAAAAAAAAAAAAAAAAA	53	NP-Poly A rechts
GCGTCCACTATTCCTGTGTGAAATGCTCA- CTGCCAAAAAAAAAAAAAAAAA	49	NP-Poly A rechts

### Die Thermocycler Programme für die verschiedenen Origamis

DNA-Origami	Literatur
Nanodisk	72
NRO	65
Nanoantenne	48

### Danksagung

Hier möchte mich bei all denen Bedanken, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben:

- An erster Stelle Prof. Dr. Philip Tinnefeld, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten und an vielen Interessanten Themen mitzuarbeiten
- Prof. Dr. Christof Maul danke ich für die Übernahme des Korreferats
- Ein großer Dank gebührt Dr. Guillermo Acuna, der mich auch bei längeren Messungen abgelöst hat, für die ständige Diskussionsbereitschaft und immer eine Lösung wusste, wenn es mal nicht weiterging
- Phil, der mir immer zur Seite stand, wenn es mal Probleme gab
- Carsten, Bettina und Guillermo für die Durchsicht dieser Arbeit
- Susanne und Alex für das Beste Büro und das immer angenehme und lockere Arbeitsklima
- Der Salatgruppe: Carsten, Guillermo, Jürgen, Sofiene, Dina und Philip. Unvergesslich sind die drei Sterne Kartoffeln, der WM-Teller und Sofienes Burger und Rippchen. Den besten Nachtisch gebührt Jürgen mit seinen Fruchtzweigen
- Johann und Rainer für die angenehme Zeit im BRICS. Besonders bei Johann möchte ich mich bedanken, der jede Messung ohne zu murren durchgeführt hat
- Bei Angela für das aushalten bei manchen längeren AFM-Messungen
- Frau Talk, die sich immer um die formalen Dinge gekümmert hat und als bürokratischer Schutzschild fungierte
- Allen Mitarbeitern des AK Tinnefelds für das schöne Arbeitsklima und auch den Spaß außerhalb der Uni. Andi du wirst unvergessen bleiben!
- Der Gruppe der Spielediele die immer für Ablenkung sorgte: Suzi, Vanessa, Jens, Mike, Matze, Sonja und Michael
- Eduard "Eddi" Bossauer für die schöne Zeit während des Studiums, das ständige Motivieren und lernen sowie die "Tanzen wie Hase" Momente im Labor
- Meiner gesamten Familie (Mama, Papa, Klaus, Ute, Piero, Hannelore und Günter) die immer für mich da gewesen sind und unterstützt haben



Zum Schluss möchte ich mich noch bei Silke und Leah-Sophie bedanken. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Danke für eure Liebe, Geduld und die manchmal späten Abende.